

Anna Szpakowska, Agata Stachowska, Agata Burzyńska, Dominika Kędys, Laura Makowska, Edward Hadaś\*

## DETERMINING THE PATHOGENICITY AND VIRULENCE OF PARASITES ON ANIMAL MODELS

### OZNACZANIE PATOGENICZNOŚCI I WIRULENCJI Z WYKORZYSTANIEM MODELI ZWIERZĘCYCH

Department of Biology and Medical Parasitology, Poznan University of Medical Sciences  
Zakład Biologii I Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

\*Corresponding Author

#### ABSTRACT

The aim of this review is to present various animal organisms used to determine the pathogenicity and virulence of old and new human and animal pathogens based on animal studies, cell cultures, macrophages and other models.

The animal models presented in this study, in addition to the most popular organisms such as the laboratory mouse, rat, guinea pig and monkey, are also less popular models, such as zebrafish (*Danio rerio*) or chicken embryos in eggs. These animals are used to study the pathogenicity of parasites such as *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* and *Besnoitia caprae* and other species.

In addition to animal models, we also present models using cell cultures, macrophages and computer methods. We also answer questions about what experimental methods allow to differentiate species and populations in terms of pathogenicity and virulence.

**Key words:** *pathogenicity and virulence, animal models, alternative animal models*

#### STRESZCZENIE

Celem niniejszego opracowania przeglądowego jest przedstawienie różnych organizmów zwierzęcych służących do oznaczania patogeniczności i wirulencji starych i nowych patogenów człowieka i zwierząt w oparciu o badania na zwierzętach, hodowlach komórkowych, makrofagach i innych modelach.

Modelami zwierzęcymi przedstawionymi w niniejszym opracowaniu, oprócz najpopularniejszych organizmów takich jak mysz laboratoryjna, szczur, świnka morska oraz małpa, są również modele mniej popularne np. ryba danio pręgowany (*Danio rerio*), czy zarodki kurze w jajach. Te zwierzęta wykorzystywane są w celu zbadania patogeniczności pasożytów takich jak *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* oraz *Besnoitia caprae* i innych gatunków.

Oprócz modeli zwierzęcych, przedstawiamy także modele z wykorzystaniem hodowli komórkowych, makrofagów oraz metody komputerowe. Odpowiadamy również na pytania jakie metody eksperymentalne pozwalają różnicować gatunki i populacje pod względem patogeniczności i wirulencji

**Słowa kluczowe:** *patogeniczność i wirulencja, modele zwierzęce, alternatywne modele zwierzęce*

#### INTRODUCTION

The use of animals in experimental research is primarily associated with the dynamic development of medicine, which dates back to ancient Greece. Already then, Aristotle and Hippocrates were

#### WSTĘP

Wykorzystywanie zwierząt w badaniach eksperymentalnych wiąże się przede wszystkim z dynamicznym rozwojem medycyny, której początki sięgają starożytnej Grecji. Już wtedy Arystoteles i Hipokrates

studying the structure and functions of the human body. Initially, the role of animals as scientific models was limited to material sections. This allowed to gain basic knowledge in the field of anatomy and physiology. Then, when anesthetics were discovered and Darwin published “*On the Origin of Species*” in 1859, there was a significant increase in the number of experiments conducted on mammals. Further factors that contributed to the escalation of animal use were the development of microbiology and Koch’s postulates, especially his claim that it was possible to prove the pathogenicity of microorganisms by successfully infecting healthy and susceptible animals.

Another key element was the publication of the book “*Introduction à l’étude de la médecine expérimentale*” by Claude Bernard (1), who in his work wrote about the use of methodology as a tool for planning physiological experiments. In the 20th century, there was a significant development in toxicology, pharmacology and immunology, combined with an increase in the frequency of research on animal models.

This was the case until the beginning of the 1980s, when the frequency of studies was reduced. The reason for this was increased public awareness of the frequent abuse and cruelty of animal models. This led to strict regulations on laboratory procedures and the creation of an animal ethics committee. However, in recent years the trend in the number of animal studies has reversed. This is due to the potential benefits of various genetic modifications (2).

The main purposes of using animals in laboratories are, of course, scientific. These include the study of infectious diseases (AIDS, Epstein-Barr disease, hepatitis B and C, and others), parasitic, metabolic, autoimmune, inflammatory, and rare diseases. Research covers a wide range of medical fields, including oncology, neurology, cardiology, toxicology, genetics, immunology and many others. In this way, research is also carried out in the areas of sleep, wound healing, behavioral factors, sensory damage and aseptic research (3-6).

The aim of this review is to present various animal organisms used to determine the pathogenicity and virulence of old and new human and animal pathogens, mainly human parasites, based on animal studies, cell cultures, macrophages and other models. Pathogenicity is the potential ability of a pathogen to enter the host. It is defined as the ratio of organisms inoculated with a pathogen to those that become infected. Virulence, on the other hand, is defined as the size of changes in infected organisms (7). The measure of virulence is usually the lethal dose ( $LD_{50}$ ).

badali budowę i funkcje ludzkiego ciała. Początkowo rola zwierząt jako modeli naukowych ograniczała się do sekcji materiału. Pozwoliło to na zdobycie podstawowej wiedzy z zakresu anatomii i fizjologii. Następnie, kiedy odkryto środki znieczulające i Darwin opublikował „*O powstawaniu gatunków*” w 1859 roku, zaobserwowano znaczny wzrost liczby eksperymentów przeprowadzanych na ssakach. Kolejnymi czynnikami, które przyczyniły się do eskalacji wykorzystywania zwierząt, był rozwój mikrobiologii i postulaty Kocha, zwłaszcza jego twierdzenie, że możliwe jest udowodnienie patogeniczności mikroorganizmów poprzez skuteczne zarażenie zdrowych i podatnych zwierząt.

Kolejnym kluczowym elementem była publikacja książki „*Introduction à l’étude de la médecine expérimentale*” Claude’a Bernarda (1), który w swojej pracy pisał o wykorzystaniu metodologii jako narzędzia planowania eksperymentów fizjologicznych. W XX wieku nastąpił znaczny rozwój toksykologii, farmakologii i immunologii, połączony ze wzrostem częstotliwości badań na modelach zwierzęcych.

Tak było do początku lat 80., kiedy to zmniejszono częstotliwość studiów. Powodem tego była zwiększona świadomość społeczna na temat częstego znęcania się i okrucieństwa wobec modeli zwierząt. Doprowadziło to do powstania surowych przepisów dotyczących procedur laboratoryjnych i powstania komisji etycznej ds. zwierząt. Jednak w ostatnich latach tendencja w liczbie badań na zwierzętach uległa odwróceniu. Wynika to z potencjalnych korzyści wynikających z różnych modyfikacji genetycznych (2).

Główne cele wykorzystywania zwierząt w laboratoriach są oczywiście naukowe. Należą do nich nauka o chorobach zakaźnych (AIDS, choroba Epsteina-Barra, wirusowe zapalenie wątroby typu B i C i inne), pasożytniczych, metabolicznych, autoimmunologicznych, zapalnych i rzadkich. Badania obejmują szeroki zakres dziedzin medycyny, w tym onkologię, neurologię, kardiologię, toksykologię, genetykę, immunologię i wiele innych. W ten sposób prowadzone są również prace badawcze w obszarach dotyczących snu, gojenia się ran, czynników behawioralnych, uszkodzeń sensorycznych oraz badań aseptycznych (3-6).

Celem niniejszej pracy przeglądowej jest przedstawienie różnych organizmów zwierzęcych służących do oznaczania patogeniczności i wirulencji starych i nowych patogenów człowieka i zwierząt, głównie pasożytów człowieka, w oparciu o badania na zwierzętach, hodowlach komórkowych, makrofagach i innych modelach.

Patogeniczność jest to potencjalna zdolność patogenu do wnikięcia do organizmu żywiciela. Jest określana jako stosunek organizmów zaszczepionych patogenem do organizmów, które uległy zarażeniu. Wirulencję natomiast określa się jako wielkość zmian

Pathogenic organisms are characterized by different pathogenicity and virulence depending on their origin, environment, host and many other factors. In the human environment, pathogenic organisms can be found next to free-living, non-pathogenic organisms or organisms with negligible pathogenicity of the same species (e.g. *Entamoeba histolytica*, free-living amoebae of the genera *Acanthamoeba* or *Naegleria*). Pathogens isolated from animals may be potentially invasive to humans or may be completely neutral. Therefore, tests for pathogenicity and virulence are performed on (among others) animals in order to extrapolate the results to humans. The condition for obtaining correct results is the proper selection of animals for the experiment.

## OVERVIEW OF ANIMAL MODELS

In the best quality animal models, the symptoms and etiology of the disease are similar to those observed in the human body. For this reason, laboratory research uses biological models – capable of reproducing a physiological or disease state that occurs in another organism. The basic function of animals used in research is to enable the study of the development and progression of specific disease entities, the identification of pathogens responsible for causing the disease and the assessment of the effectiveness of drugs. The goal is primarily to create prevention programs and develop new therapeutic strategies in the treatment of human infectious diseases. Due to their special characteristics, many animal species have been introduced into laboratories as research models (8).

The most popular and well-known animal model is the laboratory mouse model (*Mus musculus*). It is used in both biological and medical research (4). Mice owe their multiple uses to a large stock of inbred strains. This is due to the persistent population of genetic clones obtained by multiple mating of brothers and sisters. The mice of each strain are genetically identical. This makes it possible to collect data across time and space. The results of the clone tests allow for the determination of the exact characteristics of the phenotype. This is not so easy to achieve in other mammals. A defined set of genetic differences between inbred strains provides an opportunity to study the effect of genetic diversity on a particular phenotype. The low cost of maintenance, breeding and reproduction of the laboratory mouse is another of its advantages as a laboratory animal model (9).

An example of using the mouse as a model is its use in research on the pathogenicity of free-living amoeba belonging to the genus *Acanthamoeba*. These protozoa are capable of causing granulomatous

w organizmach zakażonych (7). Miarą zjadliwości jest najczęściej dawka śmiertelna ( $LD_{50}$ ).

Organizmy chorobotwórcze charakteryzują się zróżnicowaną patogennością i zjadliwością w zależności od pochodzenia, środowiska, żywiciela i wielu innych czynników. W środowisku człowieka organizmy chorobotwórcze można spotkać obok organizmów wolno żyjących, niepatogennych lub organizmów o znikomej chorobotwórczości tego samego gatunku (np. *Entamoeba histolytica*, wolnożyjące pełzaki z rodzajów *Acanthamoeba* czy *Naegleria*). Patogeny izolowane od zwierząt mogą wykazywać potencjalną inwazyjność dla ludzi lub mogą być całkowicie neutralne. Dlatego testy na patogenność i wirulencję przeprowadza się (między innymi) na zwierzętach w celu ekstrapolacji wyników na ludzi. Warunkiem uzyskania poprawnych wyników jest właściwy dobór zwierząt do przeprowadzanego doświadczenia.

## PRZEGLĄD MODELI ZWIERZĘCYCH

W najlepszej jakości modelach zwierzęcych objawy i etiologia choroby są zbliżone do obserwowanych w organizmie człowieka. Z tego powodu w badaniach laboratoryjnych wykorzystuje się modele biologiczne – zdolne do odtworzenia stanu fizjologicznego lub chorobowego występującego w innym organizmie. Podstawową funkcją zwierząt wykorzystywanych w badaniach jest umożliwienie badania rozwoju i progresji określonych jednostek chorobowych, identyfikacja patogenów odpowiedzialnych za wywołanie choroby oraz ocena skuteczności leków. Celem jest przede wszystkim tworzenie programów profilaktycznych i opracowywanie nowych strategii terapeutycznych w leczeniu chorób zakaźnych człowieka. Ze względu na ich szczególne cechy, wiele gatunków zwierząt zostało wprowadzonych do laboratoriów jako modele badawcze (8).

Najpopularniejszym i najbardziej znanym modelem zwierzęcym jest model myszy laboratoryjnej (*Mus musculus*). Jest stosowany zarówno w badaniach biologicznych, jak i medycznych (4). Myszy zawdzięczają swoje wielorakie zastosowania dużemu zasobowi szczepów wsobnych. Wynika to z trwałej populacji klonów genetycznych uzyskanych przez wielokrotne krycie braci i sióstr. Myszy z każdego szczepu są genetycznie identyczne. Umożliwia to gromadzenie danych w czasie i przestrzeni. Wyniki testów na klonach pozwalają na określenie dokładnej charakterystyki fenotypu. Nie jest to takie łatwe do osiągnięcia u innych ssaków. Zdefiniowany zestaw różnic genetycznych między szczepami wsobnymi daje możliwość zbadania wpływu różnorodności genetycznej na określony fenotyp. Niskie koszty utrzymania, hodowli i reprodukcji myszy laboratoryjnej to kolejna jej zaleta jako laboratoryjnego modelu zwierzęcego (9).

encephalitis (GAE). They may also be an important cause of severe keratitis in contact lens wearers and skin lesions in severely immunocompromised individuals (10). These rodent species have also been used in studies of the pathogenicity of *Acanthamoeba* strains isolated from fountains, their aerosols and municipal sandboxes. The use of this laboratory animal model in these cases also allowed to confirm the pathogenicity of amoebae and recognize them as a potential source of threat to human health (11).

Similar results were reported in experiments with another type of free-living amoeba. *Naegleria fowleri* is a highly virulent opportunistic parasite. The disease caused by this protozoan is *naegleriosis*, referred to as acute primary meningoencephalitis (PAM).

Studies conducted in 1979 showed that intranasal inoculation of the described species causes high mortality in mice. In addition, animal weight and age were found to influence the virulence of *N. fowleri*. With a decrease in body weight, the susceptibility of mice to amoeba infection increases. It has also been noted that younger mice are more susceptible to amoebiasis than older mice (12). In the case of *N. fowleri*, the mouse turned out to be an excellent animal model. But that's not always the case.

Mice, like humans, are the natural intermediate hosts of *Toxoplasma gondii*. The joint participation of these two species in the parasitic cycle would suggest the presence of similar defense mechanisms on the part of the immune system in response to infection. Despite the indicated dependence, this phenomenon does not occur. Infection of healthy mice with toxoplasmosis results in the death of healthy mice, unlike humans with efficient immune systems, in which the infection is asymptomatic (13). Moreover, the interaction between the parasite and leukocytes collected from toxoplasmosis-infected mice observed *in vitro* are divergent from to the human model (14), indicating that the mouse model is not suitable for determining the pathogenicity of *T. gondii* in terms of the effect of the parasite on the immune system.

Monkeys seem to be an intuitive research model due to their high genetic similarity to humans. They were used to study the pathogenicity of *Acanthamoeba*. For this species, the experiment involved intracerebral and intraspinal inoculation with amoebae, which resulted in the death of the monkeys within a few days of the onset of meningoencephalitis. These observations gave grounds for recognizing *Acanthamoeba* strains as pathogenic (15).

Great apes have also been used to study the dysentery amoeba (*Entamoeba histolytica*). *E. histolytica* is a parasitic protozoan belonging to the

Przykładem użycia myszy jako modelu jest jej wykorzystanie w badaniach nad patogenicznością pełzaków wolno żyjących należących do rodzaju *Acanthamoeba*. Te pierwotniaki są zdolne do wywoływania ziarniniakowego zapalenia mózgu (GAE). Mogą być również ważną przyczyną ciężkiego zapalenia rogówki u osób używających soczewek kontaktowych oraz zmian skórnych u osób z poważnym upośledzeniem odporności (10). Wspomniane gatunki gryzoni znalazły również zastosowanie w badaniach patogeniczności szczepów *Acanthamoeba* wyizolowanych z fontann, ich aerozoli oraz z miejskich piaskownic. Wykorzystanie tego laboratoryjnego modelu zwierzęcego w tych przypadkach pozwoliło również na potwierdzenie chorobotwórczości pełzaków i uznanie ich za potencjalne źródło zagrożenia dla zdrowia człowieka (11).

Podobne wyniki odnotowano w eksperymentach na innym rodzaju pełzaków wolno żyjących. *Naegleria fowlerii* jest wysoce zjadliwym pasożytem oportunistycznym. Chorobą wywoływaną przez tego pierwotniaka jest *naeglerioza*, określana jako ostre pierwotne zapalenie mózgu i opon mózgowych (PAM). Badania przeprowadzone w 1979 roku wykazały, że donosowe zaszczepienie opisanym gatunkiem powoduje wysoką śmiertelność u myszy. Ponadto stwierdzono, że masa ciała zwierzęcia i jego wiek wpływają na wirulencję *N. fowleri* – wraz ze spadkiem masy ciała zwiększa się podatność myszy na zarażenie pełzakami. Zauważono również, że młodsze myszy mają większą podatność na pełzaki niż starsze myszy (12). W przypadku *N. fowleri* mysz okazała się doskonałym modelem zwierzęcym, lecz nie zawsze tak jest.

Myszy, podobnie jak ludzie, są naturalnymi żywicielami pośrednimi *Toxoplasma gondii*. Wspólny udział tych dwóch gatunków w cyklu pasożytniczym sugerowałby występowanie podobnych mechanizmów obronnych ze strony układu odpornościowego w odpowiedzi na zarażenie. Mimo wskazanej zależności zjawisko to nie występuje. Zarażenie toksoplazmozą zdrowych myszy powoduje ich śmierć, w przeciwieństwie do ludzi z wydolnym układem odpornościowym, u których infekacja przebiega bezobjawowo (13). Co więcej interakcja między pasożytem a leukocytami, pobranymi od zakażonych toksoplazmozą myszy, obserwowanych w warunkach *in vitro* są rozbieżne w stosunku do modelu ludzkiego (14), co wskazuje, że model myszy nie nadaje się do określania patogenności *T. gondii* pod kątem wpływu pasożyta na układ odpornościowy.

Małpy wydają się być intuicyjnym modelem badawczym ze względu na duże podobieństwo genetyczne do ludzi. Wykorzystano je do badania patogeniczności *Acanthamoeba*. W przypadku tego gatunku eksperyment polegał na śródmózgowej i dordzeniowej inokulacji pełzakami, co skutkowało śmiercią małp w ciągu kilku dni od wystąpienia zapalenia opon mózgowych

genus *Amoebosoa* that causes a disease in humans called amoebiasis or entamoebiasis. Amoebiasis is now one of the top three causes of death from parasitic diseases (16). The disease affects 500 million people a year, and only about 50 million show symptoms. Additionally, only 10% of those infected have symptoms typical of amoebiasis; the rest are asymptomatic (17). In Poland, this disease affects only 2% of the population and occurs only in people who have returned to the country from tropical places or have been in contact with such people (11). When the parasite invades the human large intestine, it may behave as a harmless commensal or cause tissue destruction if it invades the intestinal mucosa. Less commonly, the parasite can also attack the liver, lungs, skin and brain. Then we talk about extraintestinal amoebiasis. The invasive form of *E. histolytica* is a cyst. The cyst enters the host through contaminated food or water, and then the released trophozoites migrate to the epithelial cells of the large intestine, liver, spleen or lungs, destroying them.

Since amoebiasis affects a large group of people, it is important to differentiate *E. histolytica* from other *Entamoeba* spp. species, including based on pathogenicity tests. Thanks to these studies, the presence of several non-pathogenic strains and species was also discovered, e.g. in great apes, which are also reservoirs of *E. histolytica*, but are not a source of infection for humans (16). Only humans and some primates are susceptible to enteric or extraintestinal infection with *E. histolytica*. It is worth mentioning that monkeys are not the only suitable model for studying *Entamoeba* either.

At an experimental level, hamsters and gerbils are also susceptible to *Entamoeba* infection and amoebic liver infection, while rats and mice are immune to it. Since these animals clear the parasite at different times, it can be inferred that their immune mechanisms are different. Olivos-Garcia et al. (18) showed that, unlike hamsters, gerbils and mice, in rats complement is responsible for the early elimination of the parasite.

The zebrafish (*Danio rerio*) is also a suitable animal model to determine pathogenicity. The immune system of this fish is similar to the human immune system. This fact allowed the model to be used to better understand the type of immune response responsible for fighting *Toxoplasma gondii* in humans. In the experiment, zebrafish larvae were infected by injecting trophozoites into the hindbrain of the model. These trophozoites multiplied and over time formed cysts in the brain of the fish. The parasite infecting the fish proves that *T. gondii* is virulent for this model. The study also showed that tachyzoites (trophozoites) were present in zebrafish macrophages

i rdzenia kręgowego. Obserwacje te dały podstawę do uznania szczepów *Acanthamoeba* za chorobotwórcze (15).

Małpy człekokształtne były również wykorzystywane do badania pełzaka czerwonej (*Entamoeba histolytica*). *E. histolytica* to pierwotniak pasożytniczy należący do rodzaju *Amoebosoa*, wywołujący u ludzi chorobę zwaną czerwonką pełzakową zwaną amebozą lub entamoebosą. Ameboza jest obecnie jedną z trzech najczęstszych przyczyn śmierci z powodu chorób pasożytniczych (16). Choroba ta dotyka 500 milionów ludzi rocznie, a tylko około 50 milionów wykazuje objawy. Dodatkowo tylko 10 procent zarażonych ma objawy typowe dla pełzakowicy, reszta jest bezobjawowa (17). W Polsce schorzenie to dotyczy tylko 2% populacji i występuje tylko u osób, które wróciły do kraju z miejsc tropikalnych lub miały kontakt z takimi osobami (11). Kiedy pasożyt zaatakuje jelito grube człowieka, może zachowywać się jak nieszkodliwy komensal lub powodować zniszczenie tkanki, jeśli zaatakuje błonę śluzową jelita. Rzadziej pasożyt może atakować także wątrobę, płuca, skórę i mózg. Wówczas mówimy o pełzakowicy pozajelitowej. Inwazyjną postacią *E. histolytica* jest cysta. Cysta dostaje się do organizmu żywiciela poprzez skażone jedzenie lub wodę, a następnie uwolnione trofozoity migrują do komórek nabłonka jelita grubego, wątroby, śledziony lub płuc, niszcząc je.

Ponieważ ameboza dotyka dużą grupę ludzi, ważne jest różnicowanie *E. histolytica* od innych gatunków *Entamoeba* spp., m.in. na podstawie testów patogeniczności. Dzięki tym badaniom odkryto występowanie kilku niepatogennych szczepów i gatunków obecnych np. u małp człekokształtnych, które są również rezerwuarami *E. histolytica*, ale nie są źródłem zarażenia dla ludzi (16). Tylko ludzie i niektóre naczelne są podatne na jelitowe lub pozajelitowe zarażenie *E. histolytica*. Warto wspomnieć, że małpy też nie są jedynym modelem odpowiednim do badań na *Entamoeba*.

Na poziomie doświadczalnym zwierzętami podatnymi na zarażenie *Entamoeba* i pełzakową infekcją wątroby są również chomiki i myszokoczeki, podczas gdy szczury i myszy są na to odporne. Ponieważ zwierzęta te eliminują pasożyta w różnym czasie, można wywnioskować, że ich mechanizmy odpornościowe są różne. Olivos-García i in. (18) wykazali, że w przeciwieństwie do chomików, myszokoczków i myszy, u szczurów dopełniacz odpowiada za wczesną eliminację pasożyta.

W celu oznaczenia patogeniczności, odpowiednim modelem zwierzęcym jest również ryba danio przegony (*Danio rerio*). Układ odpornościowy tej ryby jest podobny do układu odpornościowego człowieka. Fakt ten umożliwił wykorzystanie tego modelu do lepszego zrozumienia typu odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialnej za zwalczanie *Toxoplasma gondii* u ludzi.

(14). This indicates another similarity of the model to humans, because in humans macrophages are also involved in fighting this parasite during toxoplasmosis (19). Yet another experiment investigating *T. gondii* using adult zebrafish specimens found that the parasite occupied the liver, spleen, and was also present in the brain and muscles (20), which are also the habitat of *T. gondii* in humans. Another aspect proving a good selection of the model for the experiment is the anatomy of *D. rerio*. This fish has a large eye compared to the body, which can be a good place to study ocular toxoplasmosis. This would greatly improve the pathogenicity of the parasite at this site in humans (20). The above information showing the high similarity between man and fish in the course and control of toxoplasmosis suggests that it is an appropriate model for determining pathogenicity. This is also supported by the lower cost of keeping the zebrafish compared to other experimental animals (20).

#### ALTERNATIVE MODELS

With the development of science and the development of medical technology, the need for experimental facilities has increased. Animal models were used first. The number of animals used for research purposes each year is estimated in the millions (21). The already compiled statistics began to cause concern, as the subjects felt pain, stress and died as a result of some tests. Ongoing discussions and growing public outrage over the situation of laboratory animals have led to the development of the 3R strategy (22) and the enactment of numerous regulations. It should be emphasized that the ethical aspect was not the only argument in favor of limiting the number of animals used in laboratories. Keeping living organisms in a testable state is costly and time-consuming. This aspect was both the cause and the effect of far-reaching legislative changes. Alternatives to animal models that are already available and can produce quantifiable results in laboratory tests have been sought and developed.

Proxy models currently being developed make it possible to limit the use of animals to certain stages of research or to stop using them altogether. The group of surrogate models includes animal models, which are an artificial, informal group created on the basis of legal documents, in vitro cell and tissue cultures and computer models.

Surrogate models have been widely used in the study of biochemical processes, autoimmune diseases, cancer and many others, as well as in the development and testing of new therapies. They

W doświadczeniu larwy dania pręgowanego zarażono poprzez wstrzyknięcie trofozoitów do tyłomózgowia modelu. Trofozoity te namnażały się i po pewnym czasie tworzyły cysty w mózgu ryby. Pasożyt powodując zarażenie ryby dowodzi, że *T. gondii* jest zjadliwa dla tego modelu. Badanie wykazało również, że tachyzoity (trofozoity) były obecne w makrofagach danio pręgowanego (14). Wskazuje to na kolejne podobieństwo modelu do człowieka, ponieważ u ludzi makrofagi są również zaangażowane w zwalczanie tego pasożyta podczas toksoplazmozy (19). W jeszcze innym eksperymencie, badającym *T. gondii* przy użyciu dorosłych okazów danio pręgowanego, stwierdzono, że pasożyt zajmował wątrobę, śledzionę, a także był obecny w mózgu i mięśniach (20), które są również siedliskiem *T. gondii* u ludzi. Kolejnym aspektem świadczącym o dobrym doborze modelu do eksperymentu jest anatomia *D. rerio*. Ryba to ma duże oko w porównaniu do ciała, co może stanowić dobre miejsce do badania toksoplazmozy ocznej. To znacznie usprawniłoby badania patogeniczności pasożyta w tym właśnie miejscu u ludzi (20). Powyższe informacje świadczące o dużym podobieństwie między człowiekiem a rybą w przebiegu i zwalczaniu toksoplazmozy sugerują, że jest to odpowiedni model do oznaczania patogeniczności. Przemawia za tym także, niższy koszt utrzymania dania pręgowanego w stosunku do innych zwierząt doświadczalnych (20).

#### MODELE ALTERNATYWNE

Wraz z rozwojem nauki i rozwojem technologii medycznej wzrosło zapotrzebowanie na obiekty eksperymentalne. W pierwszej kolejności zaczęto wykorzystywać modele zwierzęce. Liczbę zwierząt wykorzystywanych każdego roku do celów badawczych szacuje się na miliony (21). Już wcześniej opracowane statystyki zaczęły budzić niepokój, ponieważ badani odczuwali ból, stres i umierali w wyniku niektórych testów. Toczące się dyskusje i narastające oburzenie opinii publicznej sytuacją zwierząt laboratoryjnych, doprowadziły do opracowania strategii 3R (22) i uchwalenia licznych rozporządzeń.

Należy podkreślić, że aspekt etyczny nie był jedynym argumentem przemawiającym za ograniczeniem liczby zwierząt wykorzystywanych w laboratoriach. Utrzymywanie żywych organizmów w stanie nadającym się do testowania jest kosztowne i czasochłonne. Aspekt ten był zarówno przyczyną, jak i skutkiem daleko idących zmian legislacyjnych.

Poszukiwano i opracowywano alternatywy dla modeli zwierzęcych, które są już dostępne i które mogą dać wymierne wyniki w testach laboratoryjnych. Obecnie opracowywane modele zastępcze pozwalają ograniczyć wykorzystywanie zwierząt do pewnych etapów badań

also began to be introduced into pathogenicity and virulence studies of individual pathogens.

One of the significantly used alternative models is chicken embryos in eggs. The embryos are incubated, used for research, and then killed before the nervous system is fully developed – reducing the model's suffering.

Using chicken embryo models, *Besnoitia caprae*, a parasite that has not yet been found in humans but is commonly found in domestic animals and cattle, can be studied. Little knowledge of the cycle of this parasite, which can potentially infect humans, prompted scientists to use a chicken embryo model to infect them with *B. caprae*. Once these embryos are infected, most of them die. Histopathological studies to examine the damage caused by the parasite in the embryo show that the heart and liver are affected. In the hatched embryos, involvement of the nervous system was observed, in the form of paralysis and glial hyperplasia. Results using this model suggest likely targets for *Besnoit's* attack. Early recognition of the effects of infection, thanks to chicken embryos, will allow for the development of effective treatment methods, as well as better diagnosis based on the characteristic symptoms in the case of potential human infection with this parasite. In this particular experiment, the use of fertilized chicken eggs allows for a better understanding of the *B. caprae* parasite at low cost (23).

Another parasite studied in the hen egg embryo model is *Naegleria fowleri*. The embryos were infected with amoeba suspension administered by injection into the chorioallantoic membrane of the eggs. The results indicate that younger embryos are more susceptible to amoeba infestation than older ones. However, regardless of the age of the models, all infections were fatal. In order to unambiguously demonstrate the strong virulence of the species, the studies also included the effect of the number of amoebae embedded in the embryos (24).

Studies on chicken embryos are also successful in the case of other protozoa. *Toxoplasma gondii* is a parasite showing virulence in relation to humans, very often attacking the brain and fetuses, causing termination of pregnancy (25). The results of a study in which chicken embryos were infected with *T. gondii* also indicate virulence in these animals. The models died, and post-mortem histopathology examination of the embryos showed infection of the heart and liver with parasites, suggesting the development of toxoplasmosis in these animals. However, PCR results did not show the presence of the parasite in the brain of the embryos, which distinguishes the chicken embryo model from the human model. (26). This finding could provide an answer to why

lub umożliwiają całkowite zaprzestanie ich wykorzystania.

Do grupy modeli zastępczych można zaliczyć modele zwierzęce, które są sztuczną, nieformalną grupą tworzoną na podstawie dokumentów prawnych, kultur komórkowych i tkankowych *in vitro* oraz modeli komputerowych. Modele zastępcze były szeroko stosowane w badaniu procesów biochemicznych, chorób autoimmunologicznych, raka i wielu innych, a także w opracowywaniu i testowaniu nowych terapii. Zaczęto je również wprowadzać do badań patogeniczności i wirulencji poszczególnych patogenów.

Jednym z istotnie wykorzystywanych modeli alternatywnych są zarodki kurze w jajach. Zarodki są inkubowane, wykorzystywane do badań, a następnie zabijane, zanim układ nerwowy jest w pełni rozwinięty – zmniejszając cierpienie modelu.

Korzystając z modeli zarodków kurzych, można badać *Besnoitia caprae*, pasożyta, którego nie znaleziono jeszcze u ludzi, ale powszechnie występuje u zwierząt domowych i bydła. Niewielka wiedza na temat cyklu tego pasożyta, który potencjalnie może zarażać ludzi, zachęciła naukowców do wykorzystania modelu zarodka kurzego do zarażenia ich *B. caprae*. Po zarażeniu takich zarodków, większość z nich obumiera. Badania histopatologiczne mające na celu zbadanie szkód jakie wyrządza pasożyt w zarodku, wykazują zaatakowanie serca i wątroby. U wyklutych zarodków zaobserwowano zajęcie układu nerwowego, pod postacią paraliżu i przerostu gleju. Wyniki przy użyciu tego modelu sugerują prawdopodobne cele ataku *Besnoit*a. Wczesne poznanie skutków infekcji, dzięki kurzym zarodkom pozwolą na opracowanie skutecznych metod leczenia, a także lepszej diagnozy na podstawie charakterystycznych objawów w przypadku potencjalnego zakażenia się tym pasożytem przez człowieka. W tym konkretnym doświadczeniu użycie zapłodnionych kurzych jaj umożliwi lepsze poznanie pasożyta *B. caprae*, przy niewielkich kosztach badania (23).

Innym pasożytem badanym w modelu zarodka jaja kurzego jest *Naegleria fowleri*. Zarodki zakażono zawiesiną pełzaków podaną przez wstrzyknięcie do błony kosmówkowo-omoczniowej jaj. Wyniki wskazują, że młodsze zarodki są bardziej podatne na inwazję pełzaków niż starsze. Jednak niezależnie od wieku modeli wszystkie zarażenia były śmiertelne. W celu jednoznacznego wykazania silnej zjadliwości gatunku w badaniach uwzględniono również wpływ liczby pełzaków zagnieżdżonych w zarodkach (24).

Badania na embrionach kurzych cieszą się powodzeniem również w przypadku innych pierwotniaków. *Toxoplasma gondii* jest pasożytem wykazującym wirulencję w stosunku do człowieka, atakując bardzo często mózg i płody powodując terminację ciąży (25). Wyniki badania, w którym zarodki kurze były zarażone

*T. gondii* attacks the central nervous system in humans, which could help to better fight the parasite. Infection of *T. gondii* embryos occurs at a lower LD<sub>50</sub> than in mice. These findings suggest that the chicken embryo model is suitable for determining the pathogenicity and virulence of *T. gondii*.

#### CELL AND TISSUE CULTURES

Cell culture is the maintenance of one type of cell in a medium outside of a living organism. Cells can be obtained from various organisms and organs. In addition, the collected and selected material is susceptible to modification, which broadens the scope of the model's application in various types of research. Under optimal conditions, the storage time of one group of cells is several years.

Studying the pathogenicity and virulence of *Leishmania* in animal models is an extremely time-consuming and difficult process. This pathogen, after entering the body of a vertebrate, is limited in its occurrence to macrophages, therefore, cell cultures of macrophages and cells resembling macrophages in their functions are used for experiments. The infectivity of this parasite is therefore determined by its ability to penetrate and survive in endocytic vesicles. The mouse fibroblast cell line McCoy (27) and the human monoblastic leukemia cell line U937 (28) were used to study the transformation of the promastigote to the amastigote form of *Leishmania chagasi*. McCoy and U937 cells show similar properties to macrophages, so they provide a model for the parasite-host relationship. The results of the study of *L. chagasi* on the McCoy line confirmed the theory that changes in the form of the parasite are related to biochemical changes. In addition, it was possible to follow in detail the behavior of the parasite in the presence of host cells. Hamster macrophages, on the other hand, provided the basis for *in vitro* studies on *L. donovani*. The cellular model made it possible to study the adhesive and penetrating abilities of the promastigotes and the viability of intracellular amastigotes (29). Bone marrow-derived macrophages (BMM) were used to observe the intracellular development of *L. amazonensis* in relation to genetic changes, e.g. deletion of the mitochondrial iron transporter gene *Leishmania* (LMIT1) allele. Parasites modified in this way show a reduced ability to grow inside the macrophage, which translates into reduced virulence of the pathogen (30).

Cell cultures can also be a starting point for research using animal models. *Leishmania* pathogenicity studies used peritoneal macrophages from five different primate species: *Callithrix jacchus* (common marmoset), *Callithrix penicillata*

*T. gondii* również wskazują na wirulencję u tych zwierząt. Modele padły, a badanie histopatologiczne pośmiertne zarodków wykazało zakażenie serca i wątroby pasożytami, co sugeruje rozwój toksoplazmozy u tych zwierząt. Wyniki PCR nie wykazały jednak obecności pasożyta w mózgu zarodków, co odróżnia model zarodka kurzego od modelu ludzkiego (26). To odkrycie może stanowić odpowiedź na to, dlaczego *T. gondii* atakuje u ludzi centralny układ nerwowy, co pomogłoby w lepszej walce z pasożytem. Zakażenie zarodków *T. gondii* występuje przy niższej LD<sub>50</sub> niż u myszy. Odkrycia te sugerują, że model zarodka kurzego jest odpowiedni do określania patogenności i wirulencji *T. gondii*.

#### KULTURY KOMÓRKOWE I TKANKOWE

Hodowle komórkowe polegają na utrzymywaniu komórek jednego typu w pożywce poza organizmem żywym. Komórki można uzyskać z różnych organizmów i narządów. Ponadto zebrany i wyselekcjonowany materiał jest podatny na modyfikację, co poszerza zakres zastosowania modelu w różnych typach badań. W optymalnych warunkach czas przechowywania jednej grupy komórek wynosi kilka lat.

Badanie patogeniczności i wirulencji *Leishmania* na modelach zwierzęcych jest niezwykle czasochłonnym i trudnym procesem. Patogen ten, po wnikięciu do organizmu kręgowca, jest ograniczony w swoim występowaniu do makrofagów, dlatego do eksperymentów wykorzystuje się hodowle komórkowe makrofagów oraz komórki przypominające makrofagi w swoich funkcjach. Zakaźność tego pasożyta jest zatem określona przez jego zdolność do penetracji i przeżycia w pęcherzykach endocytarnych. Linia komórkowa mysich fibroblastów McCoy (27) i linia komórkowa ludzkiej białaczki monoblastycznej U937 (28) zostały wykorzystane do zbadania transformacji formy promastigota w postać amastigota *Leishmania chagasi*. Komórki linii McCoy i U937 wykazują podobne właściwości do makrofagów, więc stanowią model odzwierciedlający relację pasożyt-gospodarz. Wyniki badań *L. chagasi* na linii McCoy potwierdziły teorię, że zmiany formy pasożyta wiążą się ze zmianami biochemicznymi. Ponadto możliwe było szczegółowe prześledzenie zachowania pasożyta w obecności komórek gospodarza. Z drugiej strony makrofagi chomika stanowiły podstawę do badań *in vitro* nad *L. donovani*. Model komórkowy umożliwił badanie zdolności adhezyjnych i penetracyjnych formy promastigota oraz żywotności wewnątrzkomórkowych form amastigota (29). Makrofagi pochodzące ze szpiku kostnego (BMM) zostały wykorzystane do obserwacji wewnątrzkomórkowego rozwoju *L. amazonensis* w odniesieniu do zmian genetycznych, np. delecja allelu genu mitochondrialnego transportera żelaza *Leishmania* (LMIT1). Tak zmodyfikowane pasożyty



(black-legged marmoset), *Saimiri sciureus* (squirrel monkey), *Callimico goeldii* (Goeldie marmoset) and *Aotus azarae infulatus* (night monkey Azara) without killing animals. The aim was to understand the processes occurring in the course of visceral leishmaniasis and to choose an appropriate animal model for further observations (31).

An *ex vivo* human colon model was used to understand the mechanisms of invasion of the human colon by *Entamoeba histolytica*. From patients operated on due to colorectal cancer, fragments of the ascending, sigmoid and descending colon were collected. The isolated material was cleared of adipose and muscle tissue, and then amoeba trophozoites were introduced. The results allowed to trace the early stages of amoebiasis that could not be observed in animal models (32).

### OTHER MODELS

On the basis of the relevant legal provisions for the protection of animals used for scientific or educational purposes, a group of living organisms belonging to the animal kingdom has been artificially distinguished that do not fall within the definitions of animals used for scientific research. Therefore, some animal organisms will be referred to as non-animal models, i.e. alternatives to animal models. This group includes mainly invertebrates (22). Non-animal models are widely used in many experiments, but their use is limited when studying the pathogenicity and virulence of specific pathogens. The main obstacle in this respect is the anatomical and histological differences between invertebrates and humans.

### COMPUTER MODELS

With current technological advances and far-reaching bioinformatics efforts, it is possible to predict certain reactions of an organism or a single cell based on computer software, which includes computer-aided drug design (CADD) and structure-activity relationships (SAR) (22). These simulations make it possible to shorten the test time by omitting certain steps in *ex vivo* and *in vivo* studies. Only those molecules and factors that have passed the screening using the simulation software are included in further research. Computer models have been readily and widely used to test drugs (33) and the consequences of genetic variation (34), but are not yet widely used to study the pathogenicity or virulence of individual pathogens due to the complexity of these processes and sometimes extremely unpredictable host responses. However, with the current pace of development of knowledge in the field of broadly

wykazują zmniejszoną zdolność do wzrostu wewnątrz makrofaga, co przekłada się na zmniejszoną zjadliwość patogenu (30).

Hodowle komórkowe mogą również stanowić punkt wyjścia do badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. W badaniach nad patogennością *Leishmania* wykorzystano makrofagi otrzewnowe pobrane od pięciu różnych gatunków naczelnych: *Callithrix jacchus* (marmozeta pospolita), *Callithrix penicillata* (marmozeta czarnoskóra), *Saimiri sciureus* (małpa sajmiri wiewiórcza), *Callimico goeldii* (marmozeta Goeldiego) i *Aotus azarae infulatus* (nocna małpa Azary) bez zabijania zwierząt. Celem było poznanie procesów zachodzących w przebiegu leiszmaniozy trzewnej i wybór odpowiedniego modelu zwierzęcego do dalszych obserwacji (31).

W celu poznania mechanizmów inwazji ludzkiej okrężnicy przez *Entamoeba histolytica* wykorzystano model ludzkiej okrężnicy *ex vivo*. Od pacjentów operowanych z powodu raka jelita grubego pobrano fragmenty okrężnicy wstępującej, esicy i zstępującej. Wyizolowany materiał oczyszczono z tkanki tłuszczowej i mięśniowej, a następnie wprowadzono trofozoity pełzaków. Wyniki pozwoliły prześledzić wczesne stadia pełzakowicy, których nie można było zaobserwować na modelach zwierzęcych (32).

### INNE MODELE

Na podstawie właściwych przepisów prawnych dotyczących ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych sztucznie wyodrębniono grupę organizmów żywych należących do królestwa zwierząt, które nie mieszczą się w definicjach zwierząt wykorzystywanych do badań naukowych. W związku z tym niektóre organizmy zwierzęce będą określane mianem modeli niezwierzęcych, tj. alternatywnych wobec modeli zwierzęcych. Do tej grupy należą głównie bezkręgowce (22). Modele niezwierzęce są szeroko stosowane w wielu eksperymentach, ale ich użycie jest ograniczone podczas badania patogeniczności i wirulencji określonych patogenów. Główną przeszkodą w tym aspekcie są różnice anatomiczne i histologiczne między bezkręgowcami a człowiekiem.

### MODELE KOMPUTEROWE

Przy obecnym postępie technologicznym i daleko idących wysiłkach bioinformatycznych możliwe jest przewidywanie pewnych reakcji organizmu lub pojedynczej komórki w oparciu o oprogramowanie komputerowe, które obejmuje komputerowe wspomaganie projektowania leków (CADD) i zależności struktura-aktywność (SAR) (22). Symulacje te pozwalają na skrócenie czasu badania poprzez pominięcie pewnych etapów badań *ex vivo* i *in vivo*. Tylko te molekuly

understood microbiology, parasitology and computer science, one can expect a significant expansion of the applications of the above-mentioned and related computer methods. The implementation of such a far-reaching replacement model could significantly reduce the number of laboratory animals.

### SUMMARY

There are many research models. Animal models are indeed needed in the world of science. However, non-animal models are now increasingly used. The most important element of the experiment is the appropriate selection of the subject on which the study is to be conducted. The most common laboratory animal is the laboratory mouse (*Mus musculus*). However, it is worth remembering that this is not a perfect model. For example, this species may not be suitable for *Toxoplasma gondii* research. Other animals such as monkeys, hamsters and fish are also used as research subjects. Thanks to regulations and a humane approach, animal models are subject to the 3R principle - Reduce, Reuse, Recycle, which significantly improves their comfort during experiments.

Alternative models and their increasingly frequent use in experiments are an interesting topic. Tissues, cells or computer models influence the development of science without endangering the health and life of animals. Chicken embryos in eggs are an important alternative to animal testing. Embryos make it possible to obtain significant results before the development of the nervous system of animals, which is of great ethical value.

### REFERENCES

1. Bernard C. Introduction à l'étude de la médecine expérimentale, 1865 In: Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Animal Welfare: global issues, trends and challenges*. *Rev Sci Tech* 2005;24(2):503-513.
2. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals, *Animal Welfare: global issues, trends and challenges*. *Rev Sci Tech* 2005;24(2):503-514.
3. Brehm MA, Jouvet N, Greiner DL, et al. Humanized mice for the study of infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 2013;5(4):428-435.
4. Młeczko M. Zwierzęta doświadczalne i laboratoryjne z pomocą człowiekowi. *Przegl Hodow* 2015;6:17-20.
5. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. Animal models in burn research. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(17):3241-3255.

i czynniki, które przeszły badania przesiewowe przy użyciu oprogramowania symulacyjnego, są objęte dalszymi badaniami. Modele komputerowe były chętnie i szeroko stosowane do testowania leków (33) i konsekwencji zmienności genetycznej (34), ale nie są jeszcze powszechnie stosowane do badania patogeniczności lub zjadliwości poszczególnych patogenów ze względu na złożoność tych procesów i czasami skrajnie nieprzewidywalne reakcje organizmu żywiciela. Jednak przy obecnym tempie rozwoju wiedzy z zakresu szeroko rozumianej mikrobiologii, parazytologii i informatyki można spodziewać się znacznego rozszerzenia zastosowań wyżej wymienionych i pokrewnych metod komputerowych. Wdrożenie tak dalekosiężnego modelu zastępczego mogłoby znacznie zmniejszyć liczbę zwierząt laboratoryjnych.

### PODSUMOWANIE

Istnieje wiele modeli badawczych. Modele zwierzęce są rzeczywiście potrzebne w świecie nauki. Jednak obecnie coraz częściej stosuje się modele bez wykorzystania zwierząt. Najważniejszym elementem eksperymentu jest odpowiedni dobór podmiotu, na którym ma być przeprowadzone badanie. Najczęstszym zwierzęciem laboratoryjnym jest mysz laboratoryjna (*Mus musculus*). Warto jednak pamiętać, że nie jest to model idealny. Na przykład gatunek ten może nie nadawać się do badań nad *Toxoplasma gondii*. Inne zwierzęta, takie jak małpy, chomiki czy ryby, również znajdują zastosowanie jako obiekty badawcze. Dzięki przepisom i humanitarnemu podejściu modele zwierzęce podlegają zasadzie 3R - Reduce, Reuse, Recycle (zmniejsz, użyj ponownie, poddaj recyklingowi), co znacznie poprawia ich komfort podczas eksperymentów.

Ciekawym tematem są modele alternatywne i coraz częstsze ich wykorzystywanie w eksperymentach. Tkanki, komórki czy modele komputerowe wpływają na rozwój nauki bez narażania zdrowia i życia zwierząt. Zarodki kurze w jajach stanowią ważną alternatywę dla testów na zwierzętach. Zarodki umożliwiają uzyskanie znaczących wyników przed rozwojem układu nerwowego zwierząt, co ma wielką wartość etyczną.

6. Hagenauer MH, Lee TM. Adolescent sleep patterns in humans and laboratory animals. *Horm Behav* 2013;64(2):270-279.
7. Hadaś E, Mazur T. Biochemical markers of pathogenicity and virulence of *Acanthamoeba* sp. Strains. *Parasit Res* 1993;79(8):696-698.
8. Animalab 2022. [Internet] Available from: <https://animalab.pl/zwierzeta-laboratoryjne>
9. Kowalczyk A. Mysz jako organizm modelowy. [Internet] Available from: <https://biotechnologia>

- pl/biotechnologia/mysz-jako-organizm-modelowy,14978
10. CDC (2019) Free living amebic infections. [Internet] Available from: [https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html?fbclid=IwAR2j9k11NyQb5tmyuoHRm4om2GsvAKZyR63OiKXv00jLUBEV0UuvzaW\\_71k](https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html?fbclid=IwAR2j9k11NyQb5tmyuoHRm4om2GsvAKZyR63OiKXv00jLUBEV0UuvzaW_71k)
  11. Hadaś E, Derda M. Pasożyty - zagrożenie nadal aktualne. *Probl Hig Epidem* 2014;95(1):6-13.
  12. Holbrook TW, Parker BW. *Naegleria fowleri* in chick embryos. Effects of embryo age and incubation temperature, and the infectivity of embryo-derived amebae for mice. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28(6):984-987.
  13. Saraf P, Schwab EK, Dubey JP, et al. On the determination of *Toxoplasma gondii* virulence in mice. *Exp Parasitol* 2017;174:25-30.
  14. Yoshida N, Peddie CJ, Yakimovich A, et al. The zebrafish as a novel model for the in vivo study of *Toxoplasma gondii* replication and interaction with macrophages. *Dis Models Mech* 2020;13(7):043091.
  15. Culbertson CG, Smith JW, Minner JR. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science* 1958;127(3313):1506.
  16. Tanyuksel M, Petri WJr. Laboratory Diagnosis of Amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 2003;16(4):713-729.
  17. Baxt L, Singh U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21(5):489-494.
  18. Olivos-García A, Saavedra E, Nequiz Avendano M, et al. Amebiasis: Molecular mechanisms of *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Facultad de Medicina UNAM* 2011;54(2):10-20.
  19. Channon, JY, Seguin RM, Kasper LH. Differential infectivity and division of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood leukocytes. *Infect Immun* 2000;68(8):4822-4826.
  20. Sanders JL, Moulton H, Moulton Z, et al. The zebrafish, *Danio rerio*, as a model for *Toxoplasma gondii*: An initial description of infection in fish. *J Fish Dis* 2015;38(7):675-679.
  21. European Commission. Summary Report on the statistics on the use of animals for scientific purposes in the Member States of the European Union and Norway in 2018. 2021.
  22. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing. *Saudi Pharm J* 2015;23(3):223-229.
  23. Namazi F, Oryan A, Namavari MM, et al. Experimental infection of embryonated eggs of chicken with *Besnoitia caprae*. *Trop Biomed* 2010;27(93):417-423.
  24. Holbrook TW. *Naegleria fowleri* in the chick embryo. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1979;73(4):460-461.
  25. Kochanowsky JA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*. *Curr Biol* 2018;28(14):R770-R771.
  26. Setasimy A, Namavari M. Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. *J Parasit Dis* 2016;40(94):1223-1225.
  27. Nogueira YL, Nakamura PM, Galati EAB. Kinetics of growth of *Leishmania (Leishmania) chagasi* cycle in McCoy cell culture. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48(6):337-341.
  28. Streit JA, Donelson JE, Agey MW, et al. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infect Immun* 1996;64(5):1810-1818.
  29. Chang KP, Dwyer D. *Leishmania Donovanii*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. *J Exp Med* 1978;14(2):515-530.
  30. Sarkar A, Khan YA, Laranjera-Siva MF, et al. Quantification of Intracellular Growth Inside Macrophages is a Fast and Reliable Method for Assessing the Virulence of *Leishmania* Parasites. *J Vis Exp* 2018;16(133):57486, doi:10.3791/57486
  31. Carneiro LA, Laurenti MD, Campes MB, et al. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to ex vivo *Leishmania (L.) infantum* chagasi-infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2012; 54(2): 95-101.
  32. Bansal D, Ave P, Kerneis S, et al. An ex-in vivo human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3(11):e551.
  33. Ramesh M, Muthuraman A. Computer-aided drug discovery (CADD) approaches for the management of neuropathic pain. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2021;21(32):2856-2868.
  34. Kircher M, Wittem DM, Jain P, et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat genet* 2014;46(3):310-315.

**Received:** 29.04.2023

**Accepted to publication:** 21.08.2023

Otrzymano: 29.04.2023 r.

Zaakceptowano do publikacji: 21.08.2023 r.

**Address for correspondence:**

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Edward Hadaś

Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej

Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

ul. Święcickiego 4,

61-701 Poznań

e-mail: ehadas@ump.edu.pl

tel.: 61 854 68 24