

BRUNA FARIAS ALVES

**Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas
processadas por maturação provenientes de animais
experimentalmente infectados**

São Paulo

2017

BRUNA FARIAS ALVES

Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Solange Maria Gennari

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3523 FMVZ	<p>Alves, Bruna Farias Viabilidade de cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados. / Bruna Farias Alves. -- 2017. 48 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Solange Maria Gennari.</p> <p>1. Bioensaio em camundongos. 2. Bioensaio em gatos. 3. Embalagem a vácuo. 4. Toxoplasmose. I. Título.</p>
-----------------	---

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados.", protocolada sob o CEUA nº 6626071114, sob a responsabilidade de **Solange Maria Gennari e equipe; Solange de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Viability of cysts of *Toxoplasma gondii* in swine wet aged meat from experimentally infected animals.", utilizing 4 Swines (4 females), 250 Heterogenics mice (250 females), 6 Cats (6 females), protocol number CEUA 6626071114, under the responsibility of **Solange Maria Gennari and team; Solange de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **12/2014** a **12/2017**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Suínos	sexo: Fêmeas	idade: a	N: 4
Linhagem:	Landrace/Duroc		Peso: a	
Origem:	Não aplicável biotério			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo: Fêmeas	idade: a	N: 250
Linhagem:	Swiss		Peso: a	
Origem:	Animais provenientes de doação espontânea			
Espécie:	Gatos	sexo: Fêmeas	idade: a	N: 6
Linhagem:	SRD		Peso: a	

Resumo: Doenças causadas por ingestão de alimentos são, em sua maioria, sub diagnosticadas e comunicadas às autoridades sanitárias. No Brasil, o *Toxoplasma gondii* foi isolado de animais produtores de alimentos como ovinos, caprinos, suínos, capivaras e galinhas, sendo um agente zoonótico de alta prevalência em praticamente todas as regiões do mundo e tem nos alimentos, em especial as carnes ingeridas cruas ou mal cozidas, uma importante via de infecção para o homem. O congelamento de carnes a temperaturas inferiores a -12oC, cozimento a 60oC, técnicas de cura (cloreto de sódio a 2% e lactato de sódio a 2%) e radiação gama a dose superior a 0,4 KGy, já provaram ser eficazes na inviabilização de cistos teciduais de *T. gondii*. O processo de maturação em cortes cárneos vem crescendo no país e permite amaciar a carne através da ação de proteases endógenas, principalmente, caspases, calpains, proteasoma e catepsinas em anaerobiose e sob refrigeração. Para isso as porções cárneas são embaladas a vácuo e estocadas sobre refrigeração (temperaturas próximas de 0oC) por períodos que variam de 7 a 21 dias. Apesar da ampla distribuição no varejo não há estudos que confirmem se este método tenha alguma ação sobre cistos teciduais de *T. gondii*.

Local do experimento:

São Paulo, 26 de junho de 2017

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 03 de agosto de 2016
CEUA N 6626071114

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Solange Maria Gennari

Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Solange Maria Gennari (orientador)

Título da proposta: "Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 19/maio/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Foi necessário haver alteração do responsável do projeto e do objetivo acadêmico, assim como do Título do projeto, para se adequar ao pedido de bolsa de Mestrado feito junto à FAPESP, e que foi aprovado (Processo 2015/20649-7) para a aluna Bruna Alves."

Comentário da CEUA: "Foi encaminhado documento de esclarecimento."

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Bruna Farias

Título: **Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus pais (Newton e Rosane) e minha irmã
(Caroline),*

Pela compreensão e respeito às minhas decisões,

*Pela confiança e carinho em todos os momentos,
apesar da distância.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre ilumina minha caminhada, me dá forças para vencer os desafios e fé para alcançar meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais, Neuton Botelho Alves e Rosane Thomaz Farias, que são meus grandes exemplos, sempre me apoiam e incentivam e fazem com que a distância não se torne um empecilho.

À minha irmã, Caroline Farias Alves, minha grande amiga, que está sempre do meu lado, vibrando a cada conquista.

À Professora Solange Maria Gennari pela amizade, ensinamentos e paciência e por permitir a realização dessa etapa.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena pelos ensinamentos, assim como pelos momentos de descontração e amizade.

Aos colegas e grandes amigos Solange de Oliveira e Herbert Sousa Soares, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho e, por fazerem com que os dias de bioensaios e trabalho fossem muito mais divertidos.

Aos amigos que conquistei durante diferentes fases da vida, sem os quais eu não teria chegado a lugar nenhum, pois os momentos de descontração e amizade foram fundamentais para o meu crescimento. Em especial aos que acompanharam esta etapa de perto: Antonio, Dani, Herbert, Ju, Marcos e Sol.

A todos que ajudaram direta e indiretamente na realização deste estudo, em especial ao Professor Carlos Adam Conte Junior (Universidade Federal Fluminense).

A todos os professores que cruzaram a minha trajetória compartilhando conhecimentos e lições de vida, em especial a Professora Tânia Regina Bettin dos Santos.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal tanto de São Paulo quanto de Pirassununga pelo acolhimento, ajuda e amizade durante a realização deste projeto. Assim como os colegas do Laboratório de Parasitárias, que tornaram o trabalho e o ambiente mais agradável.

À FAPERJ pelo apoio financeiro para realização do projeto e à FAPESP pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Meus sinceros agradecimentos!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

RESUMO

ALVES, B. F. **Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados.** [Viability of *Toxoplasma gondii* cysts in dry-aged pork from experimentally infected pigs]. 2017 48 f. Tese (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação úmida por 14, 21 e 28 dias a 0° (± 1), assim como avaliar a distribuição dos cistos em órgãos e cortes comerciais de suínos experimentalmente infectados. Para tanto, dois experimentos foram conduzidos e em ambos, os suínos foram infectados com 3.000 oocistos do isolado TgCkBr57 (BrII). O lombo foi o corte muscular escolhido para sofrer o processo de maturação por ser o corte convencionalmente utilizado para o processo. O lombo direito de cada suíno foi submetido ao processo de maturação e o esquerdo foi mantido como controle, sem processamento. No Experimento 1 três suínos foram infectados. Dos lombos processados por maturação (n=3) e controle (n=3) realizou-se bioensaio em gatos e em camundongos e o período de maturação foi de 14 dias. Nesse ensaio também avaliou-se a distribuição de cistos teciduais pelo bioensaio em camundongos do cérebro, retina, língua, diafragma e coração e de cortes musculares: lombo (m. *longissimus*), copa (m. *longissimus*, *spinalis dorsi*, *rhomboideus*), filé mignon (m. *psoas major*), coxão-duro (m. *biceps femoris*), coxão mole (m. *semimembranosus*) e alcatra (m. *gluteos medius*). No Experimento 2 seis suínos foram infectados e foi realizado o bioensaio em camundongos dos lombos que ficaram sob maturação por 14 (n=2), 21 (n=2) e 28 (n=2) dias. Em ambos os experimentos, cistos de *T. gondii* presentes nos lombos permaneceram viáveis após 14 dias de maturação úmida, com confirmação pelo bioensaio em gatos e em camundongos. Nos períodos de 21 e 28 dias, pelo bioensaio observou-se que os camundongos não se infectaram, indicando que o processo inviabilizou os cistos. Quanto à distribuição dos cistos, estes foram isolados da copa, coração, diafragma e língua dos três suínos; do filé mignon, coxão duro e cérebro de dois suínos e da

alcatra e lombo de um suíno. Nenhum camundongo infectou-se no bioensaio com o coxão mole e com a retina. Os resultados demonstram que a maturação em embalagem a vácuo por 14 dias em temperatura controlada (0°C) não foi eficaz para inativação dos cistos de *T. gondii*, porém, o processo se mostrou eficiente quando a maturação foi feita por período igual ou superior a 21 dias. Cistos de *T. gondii* foram encontrados em praticamente todos os órgãos e cortes avaliados, demonstrando a ampla distribuição do parasita em suínos e a importância dessa espécie como fonte de infecção para o homem.

Palavras-chave: Bioensaio em camundongos, bioensaio em gatos, embalagem a vácuo, toxoplasmose.

ABSTRACT

ALVES, B. F. **Viability of *Toxoplasma gondii* cysts in dry-aged pork from experimentally infected pigs.** [Viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em carnes suínas processadas por maturação provenientes de animais experimentalmente infectados]. 2017 48 f. Tese (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The objective of the present study was to evaluate the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in pork processed by dry-aged for 14, 21 and 28 days at 0° (± 1), as well as to evaluate the distribution of *T. gondii* cysts in organs and commercial cuts of experimentally infected pigs. For that, two experiments were conducted and in both the pigs were infected with 3.000 oocysts of the isolate TgCkBr57 (BrII). The loin was the muscle chosen to undergo the dry-aged because it is the cut conventionally used for the process. The right loin of each pig was submitted to the dry-aged and the left was kept as control, without processing. In Experiment 1, three pigs were infected. From the loins processed by dry-aged (n=3) e controle (n=3), the bioassay was performed on cats and mice and the aged period of the loins was 14 days. This study, also evaluated the distribution of *T. gondii* tissue cysts by bioassay in mice of brain, retina, tongue, diaphragm and hear and of the muscles: loin (m. *longissimus*), coppa (m. *longissimus*, *spinalis dorsi*, *rhomboideus*), tender loin (m. *psaos major*), outside flat (m. *biceps femoris*), topside (m. *semimembranosus*) and top sirloin (m. *gluteos medius*) was evaluated. In Experiment 2, six pigs were infected and the bioassay was performed in mice of the loins aged for 14 (n=2), 21 (n=2) and 28 (n=2) days. In both experiments, *T. gondii* cysts of the loins remained viable after 14 days of dry-aged, confirmed by bioassay in cats and mice. At 21 and 28 days, the bioassay showed that the mice did not become infected, indicating that the process made the cysts unfeasible. As to the distribution of the cysts, *T. gondii* was isolated from the coppa, heart, diaphragm and tongue of the three pigs, to the tender loin, outside flat and brain of two pigs and to the top sirloin and loin of one pig. No mice were infected in the bioassay with the topside and with the retina. The results demonstrate that the dry-aged for 14 days at controlled temperature (0°C) was not

effective for inactivation of *T. gondii* cysts, however, the process was efficient when the dry-aged was done for a period equal or righter than 21 days. *Toxoplasma gondii* cysts were found in practically all organs and cuts evaluated, demonstrating the wide distribution of the parasite in pigs and the importance of this species as a source of infection for man.

Keywords: Bioassay in mice, bioassay in cats, vacuum packaging, toxoplasmosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	20
4	CISTOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> SÃO VIÁVEIS EM CARNES SUÍNAS PROCESSADAS POR MATURAÇÃO ÚMIDA A 0°C POR 14 DIAS	21
5	DISTRIBUIÇÃO DE CISTOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> EM CORTES COMERCIAIS DE SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	34
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais estudados devido sua importância médica e veterinária. É a única espécie do gênero *Toxoplasma*, pertence à classe Protozoa e Família Sarcocystidae. *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório, com distribuição mundial e capaz de infectar animais de sangue quente, incluindo o homem (DUBEY, 2010). Foi descrito pela primeira vez em 1908, na Tunísia, no cérebro de um pequeno roedor (*Ctenodactylus gundii*) do norte da África por Nicolle e Manceaux (NICOLLE; MANCEAUX, 1908), neste mesmo ano, no Brasil, Splendore descreveu o mesmo parasita em coelhos de laboratório, no Departamento de Bacteriologia do Hospital da Sociedade de Beneficência Portuguesa de São Paulo (SPLENDORE, 1908).

Estima-se que cerca de um terço da população humana tenha sido exposto a esse parasita (HILL et al., 2006). No Brasil, a prevalência da infecção por *T. gondii* é extremamente alta (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; BARBOSA; HOLANDA; DE ANDRADE-NETO, 2009; DUBEY et al., 2012b; MAIA et al., 2012; CARMO et al., 2016) demonstrando a importância de estudos em torno do parasita para conhecimento de sua epidemiologia e realização de um controle eficiente.

O ciclo biológico de *T. gondii* é heteroxeno facultativo. Envolve dois hospedeiros, os definitivos (felídeos) e os intermediários (aves e mamíferos). O hospedeiro definitivo pode se infectar através da ingestão de oocistos ou tecidos contendo cistos com bradizoítas em seu interior e, no epitélio intestinal irá ocorrer a fase sexuada com a eliminação de oocistos não esporulados pelas fezes que, no ambiente, irão esporular, se tornando infectantes (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY, 2010). Quando ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os esporozoítas, presentes no interior dos oocistos, são liberados no tubo digestivo e penetram nas células, se multiplicando rapidamente sob a forma de taquizoíta, lisando as células. Com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro ocorre a transformação dos taquizoítas em bradizoítas, que é a forma de multiplicação lenta e eles irão ficar confinados em cistos para se proteger do sistema imunológico do hospedeiro (DUBEY, 2010). Na maioria dos casos, os cistos tecidais não causam danos e podem persistir em latência durante toda a vida do hospedeiro, sem causar resposta inflamatória (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Em alguns casos pode

ocorrer o rompimento dos cistos, porém a causa ainda não é conhecida, entretanto, sabe-se que tratamentos com drogas imunossupressoras levam à reincidência da infecção por *T. gondii* (DUBEY, 2010).

A disseminação da toxoplasmose ocorre através da transmissão transplacentária por taquizoítas, pela ingestão de tecidos animais contendo cistos infectantes e através da ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos esporulados (DUBEY, 2010). Na maioria dos casos *T. gondii* infecta o hospedeiro sem causar sinais clínicos, levando apenas a formação de cistos latentes, porém, danos severos podem ocorrer em pacientes imunossuprimidos e em casos de infecções congênitas (WEISS; DUBEY, 2009).

Mesmo sendo bastante conhecidas as fontes de infecção por *T. gondii* em humanos, ainda é necessária a implantação de medidas de controle mais eficazes para a prevenção da doença. Cook et al. (2000), em um estudo de fatores de risco para a infecção por *T. gondii* em mulheres no período pré-natal de cinco cidades europeias (Nápoles, Lausanne, Copenhagen, Oslo, Bruxelas e Milão), observaram que 30 a 63% dos casos podiam ser atribuídos ao consumo de carnes cruas ou malcozidas, mostrando a importância dessa via de infecção em algumas partes do mundo.

Pode-se dizer que a infecção por *T. gondii* em humanos depende muito de hábitos culturais e de higiene. Na França, a prevalência da infecção é alta e estudos mostraram que o mais importante fator de risco para essa alta prevalência está no hábito cultural de ingestão de carnes malcozidas ou cruas (COOK et al., 2000; KIJLSTRA; JONGERT, 2008). Em várias partes do mundo, inclusive no Brasil, surtos de toxoplasmose já foram relatados devido a este hábito (MASUR et al., 1978; BONAMETTI et al., 1997; BOYER et al., 2005).

Em Londrina, Paraná, Dias et al. (2005) adquiriram linguiças suínas tipo frescal de oito frigoríficos da região e 13 amostras foram positivas para *T. gondii* (8,7%), indicando que esta forma de produção de linguiça permite a viabilidade dos cistos teciduais do parasita.

Dentre os animais domésticos utilizados para consumo humano, os suínos se destacam como fontes de infecção para *T. gondii*. É grande o número de animais

infectados, bem como, o isolamento de *T. gondii* de tecidos de suínos, demonstrando a viabilidade dos cistos e estando, em muitos casos, relacionados a surtos da doença (DUBEY, 2009; DUBEY et al., 2012a).

Cistos teciduais de *T. gondii* são sensíveis ao cozimento tradicional, isto é, à temperatura de 60°C ou mais (DUBEY et al., 1990). Os cistos se tornam inviáveis quando a temperatura de cozimento da carne atinge 66°C na parte interna do corte. O uso de fornos de micro-ondas no cozimento de carnes não é indicado para evitar infecção por *T. gondii*, uma vez que a temperatura interna muitas vezes não atinge o mínimo necessário para matar o parasita (LUNDÉN; UGGLA, 1992).

A salga, cura e conservas de carnes já se mostraram úteis na inviabilização de cistos teciduais de *T. gondii*, entretanto estas técnicas são aplicadas de forma muito diversificadas em diferentes partes do mundo, não se podendo afirmar que todas elas sejam eficazes no controle da infecção (LUNDÉN; UGGLA, 1992; HILL et al., 2004; POTT et al., 2013). Alguns estudos com carnes curtidas mostraram que a ingestão desses derivados cárneos foram fator de risco para infecção por *T. gondii* (BUFFOLANO et al., 1996; COOK et al., 2000) e Warnekulasuriya; Johnson; Holliman (1998) obtiveram um isolamento a partir de produtos cárneos curados.

Hill et al. (2004) injetaram solução de cloreto de sódio (1% e 2%), diacetato de sódio (0,1% e 0,2%), tripolifosfato de sódio (0,25% e 0,5%), lactato de potássio (1,4% e 1,96%) ou lactato de sódio (1,4%, 1,5% e 2,0%), sós ou em combinação, em cérebros obtidos de camundongos infectados experimentalmente com *T. gondii*. Após o processo, os cérebros foram mantidos a 4°C por 7 dias e, depois desse período, estes tecidos foram utilizados para alimentar gatos negativos ao parasita (bioensaio em gatos). Lombos de suínos também foram obtidos de suínos experimentalmente infectados com *T. gondii* e injetados com as mesmas soluções e mantidos a 4°C por 7, 28 ou 45 dias antes de serem oferecidos aos gatos. As fezes de todos os gatos foram examinadas por 14 dias para observar a presença de oocistos. Os tratamentos das carnes (cérebro de camundongos e lombo suíno) com cloreto de sódio a 2% ou lactato de sódio ou potássio em concentração maior ou igual a 1,4%, quando injetados sozinhos ou em combinação, foram eficazes no controle da infecção, tornando os cistos inviáveis após um dia do tratamento.

Em estudo feito por Kotula et al. (1991) com diferentes isolados e temperaturas de congelamento, os cistos teciduais foram destruídos quando a carne foi congelada a -12°C utilizando cortes semelhantes em espessura. O tempo de cocção foi dependente do corte e da espessura da carne. A recomendação para o controle de *T. gondii* em cortes cárneos em relação à temperatura foi o congelamento por, no mínimo, dois dias a temperaturas inferiores a 12°C negativos.

Com a finalidade de estudar a viabilidade de cistos teciduais de *T. gondii* à irradiação gama, Dubey e Thayer (1994) irradiaram material cerebral de camundongos e ratos experimentalmente inoculados com diferentes linhagens do parasita. Para tal, o tecido foi embalado a vácuo e irradiado em uma fonte de Cs137 em doses de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 e 0,7 KGy a 5°C . O material irradiado foi testado em bioensaio em camundongos e em gatos. Doses a partir de 0,4 KGy tornaram os cistos inviáveis. No mesmo estudo, diferentes temperaturas (-4 , 0, 4, 8, 12 e 16°C) foram utilizadas durante a irradiação a 0,25 KGy para observar se havia algum efeito na inativação de cistos durante a irradiação e foi observado que a variação da temperatura não apresentou nenhum efeito na viabilidade dos cistos de *T. gondii*.

A viabilidade de cistos de *T. gondii* em carne embalada a vácuo foi avaliada por Neumayerová et al. (2014), em carne de caprinos jovens. Nesse estudo 50g de tecidos foram cortados em pequenos pedaços e embalados a vácuo; o processo se mostrou ineficaz na inviabilização dos cistos até o período máximo avaliado de 42 dias, armazenados a 2°C .

Atualmente, o único teste capaz de demonstrar a presença de cistos de *T. gondii* infectantes em carnes e derivados de carnes é o bioensaio em gatos ou em camundongos, além disso, o bioensaio é o teste mais eficiente na detecção do parasita sendo a forma utilizada em diversos estudos (GARCIA et al., 2006; TSUTSUI et al., 2007; DUBEY, 2010), apesar de ser um teste demorado e que depende de uso de animais para ser realizado.

A indústria cárnea busca diversas alternativas para melhorar as características organolépticas dos alimentos, aumentar a vida de prateleira e facilitar a forma de transporte dos produtos. Dentre essas alternativas, uma delas é a comercialização de carnes maturadas, que permite uma maior durabilidade dos

cortes, amaciamento e desenvolvimento de sabor característico (WARREN; KASTNER, 1992).

A maturação pode ser realizada por dois métodos: a maturação a seco e a maturação úmida. Na maturação úmida a carne é embalada a vácuo em embalagem com baixa permeabilidade ao vapor de água e gases e estocada em câmaras refrigeradas com temperatura controlada (CAMPBELL et al., 2001; AHNSTRÖM et al., 2006). Na maturação a seco a carne é estocada sem nenhuma embalagem com umidade e fluxo de ar controlado (CAMPBELL et al., 2001). A carne processada por maturação úmida propicia maior rendimento dos cortes e conveniência no transporte, sendo a mais utilizada pela indústria (WARREN; KASTNER, 1992; AHNSTRÖM et al., 2006).

O processo de maturação úmida consiste em armazenar a carne *in natura* pós-rigor, embalada a vácuo, armazenada sob refrigeração acima de seu ponto de congelamento (-1,5 °C) por um período variável e, tem por objetivo, através de alterações naturais, o amaciamento e melhor palatabilidade da carne (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; ZEOLA et al., 2007; BREWER; NOVAKOFSKI, 2008). A maturação retarda o crescimento de bactérias aeróbicas putrefativas e favorece o crescimento das bactérias lácticas, que produzem substâncias antimicrobianas, favorecendo a conservação do corte (PUGA; CONTRERAS; TURNBULL, 1999).

Para compreender o processo de maturação é preciso entender o processo logo após o abate, quando o tecido muscular permanece funcionalmente e biologicamente ativo. Devido à sangria há interrupção do sistema circulatório, cessando assim o influxo de oxigênio e o efluxo de metabólitos, com isso, há o acúmulo de ácido láctico (produto do metabolismo anaeróbico) com acidificação do meio (de neutro para 5,4—5,8), que promove a liberação de cálcio, levando à formação do complexo actomiosina a partir da ligação dos filamentos de actina e miosina. Além disso, com a depleção das reservas de glicogênio, ocorre a diminuição das reservas de ATP, o que impede a separação entre os filamentos que compõem o complexo actomiosina, caracterizando o rigor-mortis (HUFF-LONERGAN; LONERGAN, 2007; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Na resolução do rigor-mortis, há a hidrólise de proteínas mediada pelas proteases

calpaínas (μ -calpaína e m-calpaína) (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), caspases (OUALI et al., 2006), proteasoma 20S (HOUBAK; ERTBJERG; THERKILDSEN, 2008) e catepsinas, principalmente B e L (O'HALLORAN et al., 1997). A hidrólise de proteínas miofibrilares (actina e miosina) e do citoesqueleto (titina, desmina, e nebulina) promovem o rearranjo estrutural do músculo, amaciando o tecido e dando origem a compostos responsáveis pelo sabor e aroma (NOWAK, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Sabendo-se: da grande importância da infecção por *T. gondii* através da ingestão de alimentos e, em especial, por ingestão de carnes cruas ou mal cozidas; da grande prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* em animais utilizados para o consumo humano no Brasil, indicando possibilidade de presença de cistos teciduais viáveis do parasita; do isolamento de *T. gondii* já ter ocorrido na maioria das espécies animais utilizadas para o consumo humano; do aumento da disponibilidade de carnes no varejo que foram processadas pelo método de maturação e da falta de conhecimento sobre a viabilidade de cistos teciduais de *T. gondii* em carnes maturadas: o presente estudo se justifica.

3 OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivo avaliar a eficácia da técnica de maturação úmida em cortes cárneos na inviabilização de cistos teciduais de *T. gondii* e avaliar a distribuição desses cistos em cortes comerciais e órgãos de suínos experimentalmente infectados.

4 CISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* SÃO VIÁVEIS EM CARNES SUÍNAS PROCESSADAS POR MATURAÇÃO ÚMIDA A 0°C POR 14 DIAS

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos suínos processados por maturação úmida por 14, 21 e 28 dias com temperatura controlada de 0°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) provenientes de animais infectados com 3.000 oocistos do isolado TgCkBr57 (BrII). O lombo direito de cada suíno foi submetido ao processo de maturação e o esquerdo foi mantido como controle, sem processamento. Dois experimentos foram conduzidos. No Experimento 1 dos lombos de três suínos realizou-se o bioensaio em gatos e em camundongos e o período de maturação dos lombos foi de 14 dias. No Experimento 2 foi realizado o bioensaio em camundongos e os períodos de maturação dos lombos foram de 14 (n=2), 21 (n=2) e 28 (n=2) dias. Em ambos, cistos de *T. gondii* dos lombos permaneceram viáveis após 14 dias de maturação, o confirmado pelo bioensaio em gatos e em camundongos. Nos períodos de maturação de 21 e 28 dias, nenhum camundongo infectou-se, indicando que os cistos não encontravam-se viáveis. Os resultados demonstram que a maturação em embalagem a vácuo por 14 dias em temperatura controlada ($0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) não foi eficaz para inativação de cistos de *T. gondii* nos lombos, porém, a técnica foi eficiente quando o período de maturação foi igual ou superior a 21 dias.

Palavras-chave: Bioensaio em camundongos, bioensaio em gatos, embalagem a vácuo, cisto tecidual.

1. Introdução

A toxoplasmose é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*. Os gatos domésticos, assim como outros felídeos são os responsáveis pela disseminação da doença através da eliminação de oocistos pelas fezes após a infecção. Animais de sangue quente, incluindo o homem são os hospedeiros intermediários. As formas de aquisição do parasita são através de infecção congênita, ingestão de oocistos ou ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais. Em muitos casos a infecção pode ser assintomática,

porém, quando o hospedeiro se infecta durante a gestação ou encontra-se imunossuprimido a doença pode ter uma evolução grave, podendo ser fatal (DUBEY, 2010).

Em muitos países, assim como no Brasil, os suínos são um dos animais de produção de maior importância na transmissão de *T. gondii*, estando, em muitos casos, relacionados a surtos de toxoplasmose (DUBEY, 2009; DUBEY et al., 2012b). Nessa espécie, os cistos teciduais do coccídio podem se manter viáveis por períodos superiores a dois anos, demonstrando sua importância epidemiológica na transmissão do parasita (DUBEY, 1988).

A infectividade dos cistos teciduais de *T. gondii*, é demonstrada apenas pelo bioensaio em gatos ou em camundongos, embora seja um teste demorado e que depende do uso de animais (DUBEY, 2010).

Cozimento da carne em temperatura interna mínima de 66°C (DUBEY et al., 1990), assim como o congelamento da mesma a temperatura interna de -12°C (KOTULA et al., 1991) são procedimentos eficazes na inativação de cisto teciduais de *T. gondii*. A salga, cura e conservas de carnes também se mostraram eficientes na inviabilização de cistos do coccídio, porém, essas técnicas não são padronizadas, logo, não se pode garantir que todas elas sejam eficazes no controle da transmissão do parasita (LUNDÉN; UGGLA, 1992; NAVARRO et al., 1992; DIAS et al., 2005; DUBEY, 2010).

Neumayerová et al. (2014) avaliaram a viabilidade de cistos de *T. gondii* em 50g de carne de caprinos jovens experimentalmente infectados, cortados em pequenos pedaços e embalados a vácuo. O processo se mostrou ineficaz na inviabilização dos cistos até o período máximo avaliado de 42 dias de armazenamento em câmara refrigerada a 2°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

A indústria de carne comercializa amplamente produtos armazenados em embalagens a vácuo devido ao maior rendimento dos cortes e conveniência no transporte (WARREN; KASTNER, 1992), além de apresentar melhoria dos aspectos sensoriais da carne (LI et al., 2014). Esse processo é denominado maturação úmida e consiste no envolvimento do corte cárneo em embalagem para vácuo permeável a umidade e armazenamento sob refrigeração durante um período específico (AHNSTRÖM et al., 2006). Esse período é variável e não é padronizado (WARREN; KASTNER, 1992). Durante o período de maturação ocorre a transformação do músculo em carne através de complexas vias bioquímicas, com proteases

endógenas como caspases (OUALI et al., 2006), calpaínas (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006) e catepsinas (O'HALLORAN et al., 1997) hidrolisando proteínas do tecido muscular.

A viabilidade dos cistos de *T. gondii* em cortes comerciais maturados em embalagem a vácuo, não é conhecida. Este estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade de cisto de *T. gondii* em lombos suínos processados por maturação úmida provenientes de suínos experimentalmente infectados.

2. Material e Métodos

2.1. Infecção Experimental dos Suínos

Suínos da raça Large White x Landrace, fêmeas, com idade aproximada de 90 dias, previamente avaliados sorologicamente como negativos a anticorpos anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (CAMARGO, 1964), com ponto de corte 1:64 (GARCIA et al., 1999), foram experimentalmente infectados com uma suspensão de 3.000 oocistos do isolado TgCkBr57 (DUBEY et al., 2003) tipo BrII (DUBEY et al., 2008). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em baias teladas, sendo fornecido água *ad libitum* e ração, formulada de acordo com as necessidades básicas da espécie e faixa etária. Com a idade aproximada de 150 dias foi realizado o abate dos animais, a carcaça foi dividida em duas partes (lado direito e esquerdo) e os órgãos foram coletados para a confirmação da infecção dos suínos. As carcaças foram mantidas a $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e, após esse período, foi realizada a coleta dos lombos (*m. longissimus*).

2.2. Processo de maturação úmida em embalagens a vácuo

Os lombos foram embalados individualmente em embalagens para vácuo com sete camadas à base de poliamida e polietileno (MRP VAC 100, Gabrilina, Brasil). O fabricante declara que a embalagem possui variação de largura plana de ± 5 mm, espessura nominal de $100 (\pm 10\%) \mu\text{m}$ e gramatura de $52 (\pm 10\%) \text{g/m}^2$. Além disso, declara permeabilidade de $\text{O}_2 < 60 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{dia}$ a 25°C , 0% de umidade relativa e permeabilidade de vapor de água $< 10 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ a 38°C , 90% de umidade relativa.

Após a embalagem dos cortes foi retirado o ar e selada a embalagem, utilizando uma embaladora a vácuo Multivac (C300, Multivac, Alemanha). Os cortes foram armazenados a $0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante o período de 14, 21 e 28 dias. A

temperatura da câmara fria em que os cortes ficaram armazenados foi medida por termômetro digital (K29-7070, Kasvi, Brasil).

Foi realizada a aferição do pH dos lombos maturados na porção cranial, medial e caudal do corte, tanto antes do início do processo como após o respectivo período com pHmetro de bancada (PG 1800, Gehaka, Brasil).

Foram realizados dois experimentos distintos, aqui detalhados: Experimento 1 e Experimento 2.

2.3. Experimento 1

Foram utilizados três suínos (A, B e C), sendo que o lombo esquerdo de cada suíno foi mantido como controle e o lombo direito foi submetido ao processo de maturação por 14 dias. Foi realizado o bioensaio em seis gatos, sem raça definida, com idade média de cinco anos, soronegativos para a presença de anticorpos contra *T. gondii* (RIFI<16). Durante todo o período os animais receberam água *ad libitum* e ração comercial em quantidade adequada.

Três gatos receberam, a partir do dia posterior ao abate, durante quatro dias, via oral, carne proveniente dos lombos não maturados, sendo utilizado um gato para cada músculo. Após os 14 dias de maturação, os outros três gatos receberam, pelo mesmo período, a carne dos lombos maturados, também utilizando um gato para cada lombo. As fezes totais desses animais foram colhidas e pesadas diariamente a partir do terceiro dia da ingestão dos cortes cárneos e examinadas, por 30 dias, pela técnica de flutuação em solução em sacarose ($d=1,203\text{g/cm}^3$) (OGASSAWARA; BENASSI, 1980), para pesquisa de oocistos de *T. gondii*. Os oocistos eliminados por cada gato foram contados em câmara hematimétrica e quando a quantidade de oocistos não era suficiente para essa contagem, foi realizada a quantificação através da técnica de flutuação em sacarose até o esgotamento dos oocistos. Os gatos permaneceram em gaiolas apropriadas para a espécie, individualizados e em alojamentos distintos, para evitar possíveis contaminações cruzadas. Ao final do experimento, foi realizada nova colheita de sangue dos gatos para confirmar pela sorologia (RIFI \geq 16), a presença de anticorpos anti-*T. gondii* pós-infecção (p.i.).

Além do bioensaio em gatos, foi realizado o bioensaio em camundongos do diafragma e língua e dos lombos controle e maturado de cada suíno, seguindo o protocolo de Dubey (1998). Para a digestão dos lombos, o protocolo sofreu algumas alterações. Estes eram cortados em pequenos pedaços, homogeneizados e

retirados 50g para cada digestão e, ao invés de centrifugar 250ml do conteúdo digerido, era realizado uma centrifugação extra com os 250ml restantes para aumentar a quantidade de inóculo.

Foram inoculados cinco camundongos por órgão (50g de tecido/5 camundongos) e dez camundongos por lombo (100g de tecido digerido/10 camundongos). Os camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados para a pesquisa de *T. gondii* nos tecidos (cistos ou taquizoítos). Foi realizada colheita de sangue dos animais que sobreviveram até seis semanas p.i. e examinados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii*, por meio do Teste de Aglutinação Modificado (DUBEY; DESMOND, 1987), na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997). Depois do resultado da sorologia foi realizada a eutanásia dos camundongos em câmara contendo isofluorano, previamente sedados com uma combinação de xilazina/quetamina e, então, tiveram seu tecido cerebral examinado microscopicamente para a presença de *T. gondii* e confirmação do resultado sorológico.

2.4. Experimento 2

Seis suínos previamente infectados como anteriormente descrito, foram divididos em três grupos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3). O lombo esquerdo de cada suíno foi utilizado como controle e o lombo direito foi submetido ao processo de maturação por 14 (Grupo 1), 21 (Grupo 2) e 28 (Grupo 3) dias. Foi realizado o bioensaio em camundongos, conforme descrito no Experimento 1, de diafragma, língua e lombos controle e maturado. Foram inoculados cinco camundongos com os tecidos do diafragma e da língua e, para aumentar a quantidade de material dos lombos digeridos (300 g), foram inoculados 30 camundongos para cada corte.

2.5. Ética animal

Todos os animais foram manuseados de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, Brasil (CEUA n. 6626071114).

3. Resultados

3.1. Experimento 1

A média de peso dos lombos foi de 1.866g. A média do pH dos lombos antes de serem embalados foi de 5,44 ($\pm 0,02$) e após o processo de maturação por 14 dias foi de 5,56 ($\pm 0,03$), não apresentando grande variação em relação ao animal nem quanto as porções mensuradas.

Os gatos que receberam o lombo suíno maturado assim como os que consumiram o corte controle eliminaram oocistos de *T. gondii*. A eliminação ocorreu do sexto ao nono dia pós-ingestão dos lombos. A quantidade de lombo consumida pelos gatos e a quantidade de oocistos eliminada por cada gato durante o período experimental está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Consumo (g) dos lombos suínos controles e maturados e quantidade de oocistos de *T. gondii* eliminados por cada gato do Experimento 1.

Suíno*	Lombo	Gato	Consumo (g)	Oocistos eliminados
A	Controle	1	487	11×10^7
	Maturado	2	298	$0,4 \times 10^7$
B	Controle	3	320	17×10^7
	Maturado	4	329	40×10^7
C	Controle	5	230	53×10^7
	Maturado	6	291	1×10^7

*Suínos inoculados com 3.000 oocisto de *T. gondii*.

Os resultados obtidos pelo bioensaio em camundongos, realizado com diafragma, língua e lombos suínos do Experimento 1 encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Número de camundongos infectados por *T. gondii* no bioensaio do diafragma, língua, lombo não maturado (controle) e lombo maturado por 14 dias dos suínos A, B e C do Experimento 1.

	Suíno A*	Suíno B*	Suíno C*	Total
Diafragma	2/5 (40)	5/5 (100)	4/5 (80)	11/15 (73)
Língua	1/5 (20)	4/5 (80)	5/5 (100)	10/15 (67)
Lombo controle	0/10 (0)	6/10 (60)	0/10 (0)	6/30 (20)
Lombo maturado	0/10 (0)	2/10 (20)	0/10 (0)	2/30 (7)

*Número de camundongos infectados/número de camundongos inoculados (% positivos).

3.2. Experimento 2

A média de peso dos lombos foi de 2.150g. A média do pH dos lombos antes de serem embalados foi de 5,43 ($\pm 0,06$) e após o processo de maturação 5,66 ($\pm 0,06$), não apresentando grande variação em relação aos animais, às porções mensuradas e aos períodos de maturação.

Os resultados obtidos pelo bioensaio em camundongos, realizados com diafragma, língua e lombos dos animais dos grupos: 1 (14 dias de maturação), 2 (21 dias) e 3 (28 dias) encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Número de camundongos infectados por *T. gondii* pelo bioensaio do diafragma, língua e lombo não maturado (controle) e lombo maturado dos suínos do Grupo 1 (lombo maturado por 14 dias), Grupo 2 (lombo maturado por 21 dias) e Grupo 3 (lombo maturado por 28 dias) do Experimento 2.

	Grupo 1*			Grupo 2*			Grupo 3*		
	14 dias			21 dias			28 dias		
	Suíno D	Suíno E	Total	Suíno F	Suíno G	Total	Suíno H	Suíno I	Total
Diafragma	4/5 (80)	3/5 (60)	7/10 (70)	5/5 (100)	0/5 (0)	5/10 (50)	5/5 (100)	4/5 (80)	9/10 (90)
Língua	1/5 (20)	4/5 (80)	5/10 (50)	5/5 (100)	5/5 (100)	10/10 (100)	1/5 (20)	4/5 (80)	5/10 (50)
Lombo controle	3/30 (10)	14/30 (47)	17/60 (28)	7/30 (23)	0/30 (0)	7/60 (12)	0/30 (0)	15/30 (50)	15/60 (25)
Lombo maturado	3/30 (10)	0/30 (0)	6/60 (5)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/60 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/60 (0)

*Número de camundongos infectados/número de camundongos inoculados (% positivos).

4. Discussão

Os valores de pH das porções cárneas avaliadas estão de acordo com o observado por Juárez et al. (2011). Sabe-se que após alguns dias de maturação ocorre uma diminuição no teor de umidade e perda por gotejamento sendo observado, um leve aumento nos valores de pH.

Em ambos os experimentos, os cistos de *T. gondii* dos lombos suínos permanecem viáveis depois de 14 dias de maturação úmida, com confirmação pelo bioensaio em gatos (Experimento 1) e em camundongos (Experimento 1 e 2). Foi observada uma diminuição no número de camundongos infectados dos lombos maturados por 14 dias em relação aos controles, o que pode indicar uma diminuição na quantidade de cistos viáveis na carne durante o processo de maturação. Como o período de 14 dias de maturação não se mostrou um tempo adequado para inviabilização dos cistos, foi delineado o Experimento 2 (14, 21 e 28 dias de maturação) e, pelo bioensaio em camundongos confirmou-se que 14 dias não inviabiliza todos os cistos, entretanto a maturação por 21 e 28 dias inviabilizou os cistos dos cortes cárneos.

O bioensaio em gatos é uma técnica de maior sensibilidade para o isolamento de *T. gondii* por serem alimentados com maior quantidade de tecidos aumentando a possibilidade de ingestão de cistos (DUBEY, 2010). No presente estudo os gatos ingeriram em média 325g de lombo. No bioensaio em camundongos, para aumentar a quantidade de material inoculado nesses animais foi adicionado ao processo uma centrifugação extra permitindo que os 50g de tecido digerido, isto é, 100% do material processado, fossem inoculados em cinco camundongos e com isso os bradizoítas presentes fossem usados em sua totalidade nas inoculações.

Neumayerová et al. (2014) avaliaram a viabilidade de cistos de *T. gondii* em carne de caprinos infectados experimentalmente com 20.000 oocistos e abatidos com 64-68 dias de idade. A maturação a vácuo foi feita em 50g de lombo e músculos do pernil cortados em pequenos pedaços (1cm x 1cm). A maturação úmida não inviabilizou os cistos até o período máximo avaliado de 42 dias a 2°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). A diferença do resultado com o encontrado no presente estudo, pode ser devido à alta dose de inóculo utilizada na infecção dos caprinos e por eles terem

sido abatidos muito jovens, permitindo que fosse utilizado grande parte dos músculos nos bioensaios e, com isso, favorecendo a presença de uma maior quantidade de cistos. No presente estudo, os animais foram abatidos no peso de terminação para a espécie (\pm 90kg), sendo fornecido menos da metade da totalidade do corte comercial, visto que foi utilizado uma média de 325g no bioensaio em gatos e 300g no bioensaio em camundongos dos lombos que pesaram média de 1.866g (Experimento 1) e 2.150g (Experimento 2).

O período de maturação não é padronizado pela legislação (WARREN; KASTNER, 1992). Quanto maior o tempo de maturação, mais caro o processo se torna para a indústria, com despesas com espaço e refrigeração. Os períodos mais comuns de maturação para as carnes processadas pelas indústrias brasileiras, são inferiores a 14 dias segundo as informações contidas nas embalagens das carnes comercializadas. Entretanto, o presente estudo mostra que no tangente a segurança alimentar e infecção por *T. gondii* 14 dias de maturação não inviabiliza os cistos teciduais. Para maior precisão, períodos superiores a 14 e inferiores a 21 dias devem ser testados e estas informações disponibilizadas às indústrias cárneas, que utilizariam o período mínimo de maturação, entretanto de forma segura.

A transmissão de *T. gondii* pelo consumo de carne suína é um grave problema de saúde pública, uma vez que um suíno infectado com o peso de terminação (cerca de 100 kg) pode render mais de 600 porções individuais de carne (DUBEY et al., 2012a), demonstrando a importância de buscar tecnologias de produção para diminuir o risco de infecção por este coccídio. Com o aumento da disponibilidade de carnes maturadas nos mercados no mundo todo, o presente estudo com 14, 21 e 28 dias de maturação demonstra que 14 dias, o mais utilizado pelas indústrias brasileiras, não inviabiliza cistos teciduais de *T. gondii*.

Agradecimentos

À FAPERJ (26/010.001556/2014) pelo auxílio financeiro para execução do projeto de pesquisa, à FAPESP (2015/20649-7) pela bolsa de mestrado a B. F. Alves e ao CNPq pela bolsa de produtividade a S. M. Gennari e C. A. Conte Junior.

Referências

AHNSTRÖM, M. L.; SEYFERT, M.; HUNT, M. C.; JOHNSON, D. E. Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. **Meat Science**, v. 73, p. 674–679, 2006.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117–118, 1964.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V. de; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and seroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 185–189, 2005.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 910–913, 1988.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: Stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 1997.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75–77, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs — The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2^a ed. Florida: Boca Raton. 2010

DUBEY, J. P.; DESMOND, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Vet. J.**, v. 19, p. 337–339, 1987.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SILVA, D. S. da; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: Mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851–853, 2003.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; ROZEBOOM, D. W.; RAJENDRAN, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 14–18, 2012a.

DUBEY, J. P.; KOTULA, A. W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C. D.; LINDSAY, D. S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 201–204, 1990.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375–424, 2012b.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 157, p. 299–305, 2008.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. de. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91–97, 1999.

JUÁREZ, M.; CAINE, W. R.; DUGAN, M. E. R.; HIDIROGLOU, N.; LARSEN, I. L.; UTTARO, B.; AALHUS, J. L. Effects of dry-ageing on pork quality characteristics in different genotypes. **Meat Science**, v. 88, p. 117–121, 2011.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat science**, v. 74, p. 34–43, 2006.

KOTULA, A. W.; DUBEY, J. P.; SHARAR, A. K.; ANDREWS, C. D.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687–690, 1991.

LI, X.; BABOL, J.; BREDIE, W. L. P.; NIELSEN, B.; TOMÁNKOVÁ, J.; LUNDSTRÖM, K. A comparative study of beef quality after ageing longissimus muscle using a dry ageing bag, traditional dry ageing or vacuum package ageing. **Meat Science**, v. 97, p. 433–442, 2014.

LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 3–4, p. 357–363, 1992.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; MITSUKA, R. Resistência do *Toxoplasma gondii* ao cloreto de sódio e aos condimentos em linguiça de suínos. **Boletim of Sanit. Panam.**, v. 112, n. 2, p. 138–143, 1992.

NEUMAYEROVÁ, H.; JURÁNKOVÁ, J.; SALÁKOVÁ, A.; GALLAS, L.; KOVAŘČÍK, K.; KOUDELA, B. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. **Food Microbiology**, v. 39, p. 47–52, 2014.

O'HALLORAN, G. R. O.; TROY, D. J.; BUCKLEYB, D. J.; REVILLE, W. J. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, v. 47, n. 3/4, p. 187–210, 1997.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S. Infecção experimental de gatos com coração de bovino parasitado por *Sarcocystis sp.* **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 1–2, p. 27–32, 1980.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 44–58, set. 2006.

WARREN, K. E.; KASTNER, C. L. A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef strip loins. **Journal of Muscle Foods**, v. 3, n. 2, p. 151–157, 1992.

5 DISTRIBUIÇÃO DE CISTOS DE *TOXOPLASMA GONDII* EM ÓRGÃOS E CORTES COMERCIAIS DE SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS

Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar a distribuição de cistos teciduais de *Toxoplasma gondii* em órgãos e cortes musculares comerciais de suínos experimentalmente infectados. Os suínos foram infectados com 3.000 oocistos do isolado TgCkBr57 (Brll). Foi realizado o bioensaio em camundongos de cérebro, retina, língua, diafragma e coração e cortes musculares: lombo (m. *longissimus*), copa (m. *longissimus*, *spinalis dorsalis*, *rhomboideus*), filé mignon (m. *psaos major*), coxão-duro (m. *biceps femoris*), coxão mole (m. *semimembranosus*) e alcatra (m. *gluteos medius*). *Toxoplasma gondii* foi isolado de todos os três suínos infectados e o parasita foi isolado da copa, coração, diafragma e língua dos três suínos; do filé mignon, coxão duro e cérebro de dois suínos e da alcatra e lombo de um suíno. No bioensaio nenhum camundongo infectou-se com o coxão mole e com a retina. Foi possível observar a viabilidade dos cistos de *T. gondii* em praticamente todos os órgãos e cortes avaliados, demonstrando a ampla distribuição do parasita em órgãos e tecidos de suínos e a importância dessa espécie como fonte de infecção para o homem.

Palavras-chave: Bioensaio em camundongos, porcos, toxoplasmose.

Toxoplasma gondii é um dos parasitas mais bem sucedidos do mundo, sendo capaz de infectar animais de sangue quente (mamíferos e aves), incluindo o homem (DUBEY, 2010). Estima-se que cerca de um terço da população humana tenha sido exposta a essa parasita (HILL et al., 2006). No intestino dos felídeos ocorre a reprodução sexuada do *T. gondii*, que irá resultar na eliminação de oocistos pelas fezes e no ambiente irão esporular se tornando infectantes. A ingestão dos oocistos pelo hospedeiro intermediário irá resultar na formação de cistos teciduais microscópicos em órgãos e musculatura, a ingestão de carne crua ou malcozida é uma das principais fontes de infecção humana por *T. gondii*, sendo responsável por grande parte dos casos humanos de toxoplasmose (DUBEY, 2010). O parasita

também pode ser transmitido pela via transplacentária, da mãe para o feto (DUBEY, 2009a). A doença normalmente é assintomática, porém mulheres grávidas podem transmitir ao feto o coccídio e resultar em aborto, morte neonatal, hidrocefalia e outros problemas neurológicos e indivíduos com alguma imunossupressão também podem apresentar a doença de forma aguda (WEISS & DUBEY, 2009).

Os suínos são os animais de produção de maior eficiência como reservatórios de cistos de *T. gondii* (DUBEY, 2009b) e estudos epidemiológicos demonstram uma alta soroprevalência do parasita nessa espécie ao redor do mundo (HUONG; DUBEY, 2007; DUBEY, 2009a; VERONESI et al., 2011; BACCI et al., 2015; STEINPARZER et al., 2015; SAMICO-FERNANDES et al., 2017). Nas últimas décadas, práticas de biossegurança e biosseguridade em granjas de suínos têm resultado na diminuição da infecção por *T. gondii* pelos suínos confinados, porém, a procura crescente por porcos orgânicos está fazendo com que o sistema de criação de suínos não-confinados cresça, aumentando potencialmente o risco desses animais terem acesso a pastagens e material orgânico contaminados com fezes de gato e se infectarem por *T. gondii* pela ingestão de oocistos (KIJLSTRA et al., 2004; KIJLSTRA; JONGERT, 2008).

Em vista da importância epidemiológica mundial da transmissão de *T. gondii* através de carne suína infectada, o presente estudo objetivou avaliar a distribuição de cistos teciduais do coccídio em órgãos e cortes musculares comerciais de suínos experimentalmente infectados.

Foram utilizados três suínos da raça Large White x Landrace, fêmeas, com idade aproximada de 90 dias, previamente avaliados sorologicamente como negativos a anticorpos anti-*T. gondii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (CAMARGO, 1964), com ponto de corte 1:64 (GARCIA et al., 1999), foram experimentalmente infectados por via oral com uma suspensão de 3×10^3 oocistos do isolado TgCkBr57 (DUBEY et al., 2003) tipo Brill (DUBEY et al., 2008). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em baias teladas, sendo fornecido água *ad libitum* e ração formulada de acordo com as necessidades básicas da espécie e faixa etária. Semanalmente foi realizada a colheita de sangue para acompanhamento dos títulos de anticorpos séricos anti-*T. gondii*. Com idade aproximada de 150 dias e peso aproximado de 90kg, foi realizado o abate dos animais e coletou-se: cérebro, retina, língua, diafragma e coração e as carcaças foram mantidas a $4^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após foi realizada a desossa e

separados os cortes musculares: lombo (m. *longissimus*), copa (m. *longissimus, spinalis dorsi, rhomboideus*), filé mignon (m. *psoas major*), coxão-duro (m. *biceps femoris*), coxão mole (m. *semimembranosus*) e alcatra (m. *gluteos medius*).

Para realização do bioensaio em camundongos os órgãos e cortes musculares foram cortados em pequenos pedaços e separou-se, aleatoriamente, 50g de tecido, conforme o protocolo descrito por Dubey (1998). Para cada órgão ou músculo, cinco camundongos albinos Swiss, com dois meses de idade, foram inoculados por via subcutânea (1 ml/camundongo).

Os camundongos inoculados que vieram a óbito foram examinados em busca de *T. gondii* nos tecidos (pulmão e cérebro), conforme descrito por Dubey (2010). Os que sobreviveram por seis semanas pós-infecção (p.i.) foram examinados sorologicamente através do Teste de Aglutinação Modificado (DUBEY; DESMOND, 1987) com ponto de corte de 1:25 (DUBEY, 1997) e submetidos à eutanásia. O resultado da sorologia foi confirmado pela pesquisa de cistos no cérebro e o camundongo foi considerado positivo quando cistos foram observados.

Todos os animais foram manuseados de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (CEUA n. 6626071114).

O isolado TgCkBr57 foi obtido de uma galinha do estado do Rio de Janeiro, e é considerado de virulência intermediária. Os três suínos inoculados infectaram-se, como comprovado pela sorologia e pelo bioensaio em camundongos. A soroconversão para anticorpos anti-*T. gondii* foi detectada na coleta realizada no 14º dia p.i. e os títulos variaram de 64 a 1024 durante o período experimental de 60 dias.

Toxoplasma gondii foi isolado da copa, coração, diafragma e língua dos três suínos; do filé mignon, coxão duro e cérebro de dois suínos e da alcatra e lombo de um suíno. Nenhum camundongo infectou-se no bioensaio realizado com o coxão mole e com a retina (tabela 1).

Tabela 1. Bioensaio em camundongos de tecidos e órgãos de suínos experimentalmente infectados por *T. gondii*.

		Nº suíno*			Total de camundongos*
		1	2	3	
Tecido*	Alcatra	0/5 (0)	5/5 (100)	0/5 (0)	5/15 (33)
	Copa	5/5 (100)	4/5 (80)	2/5 (40)	11/15 (73)
	Coxão duro	3/5 (60)	4/5 (80)	0/5 (0)	7/15 (47)
	Coxão mole	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/15 (0)
	Filé mignon	1/5 (20)	1/5 (20)	0/5 (0)	2/15 (13)
	Lombo	0/5 (0)	3/5 (60)	0/5 (0)	3/15 (20)
Órgão*	Cérebro	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)	5/15 (33)
	Coração	4/5 (80)	1/5 (20)	2/5 (40)	7/15 (47)
	Diafragma	2/5 (40)	5/5 (100)	4/5 (80)	11/15 (73)
	Língua	1/5 (20)	4/5 (80)	5/5 (100)	10/15 (67)
	Retina	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/15 (0)

*Número de camundongos infectados/inoculados (%).

Dubey et al. (1986) também avaliaram a distribuição de cistos de *T. gondii* em cortes comerciais e órgãos de dois suínos experimentalmente infectados. Da língua, diafragma, coração e cérebro *T. gondii* foi isolado de 100% dos suínos, resultado semelhante ao do presente estudo, com exceção do cérebro que neste foi de 66%. Com relação aos cortes comerciais Dubey et al. (1986) isolaram do pernil dos dois suínos e de apenas um lombo. O pernil abrange, dentre outros cortes, a alcatra, o coxão mole e o coxão duro que foram avaliados separadamente no presente estudo e que em conjunto foram isolados de dois dos três suínos avaliados.

Em outro estudo Dubey (1988) infectou 16 suínos com *T. gondii* e 14 desses se infectaram. O cérebro foi o órgão que permitiu o maior número de isolados (12 animais), seguido do coração (11 animais), língua (10 animais) e diafragma (6 animais), dos cortes musculares avaliados foi possível o isolamento em cinco suínos utilizando o pernil.

A porcentagem de 100% de animais nos quais foi possível o isolamento no presente estudo, difere do obtido por Yai et al. (2003) que isolaram *T. gondii* de somente quatro dos oito suínos inoculados. Vale ressaltar que a dose utilizada por Yai e colaboradores foi superior a do presente estudo, embora seja de um diferente isolado, entretanto estes autores obtiveram isolados da retina de dois suínos, mas de nenhum suíno obteve-se isolado de cérebro, resultado inesperado.

Tsutsui et al. (2007) infectaram 10 suínos com *T. gondii* e, pelo bioensaio em camundongos de cortes cárneos, de cinco suínos foi possível o isolamento do agente, sendo que de quatro suínos foi isolado do pernil e de três suínos do lombo. Todos os animais soroconverteram para anticorpos anti-*T. gondii* e os títulos variaram nos mesmos valores dos encontrados no presente estudo (64 – 1024).

Nos suínos do presente estudo, foi possível observar a viabilidade dos cistos de *T. gondii* em praticamente todos os órgãos e cortes avaliados, demonstrando a ampla distribuição do parasita em suínos e a importância dessa espécie como fonte de infecção para o homem, confirmando a necessidade de uma especial atenção no uso dessas carnes para consumo humano.

Agradecimentos

À FAPERJ (26/010.001556/2014) pelo auxílio financeiro para execução do projeto, à FAPESP (2015/20649-7) pela bolsa de mestrado a B. F. Alves e ao CNPq pela bolsa de produtividade a S. M. Gennari e C. A. Conte Junior.

Referências

BACCI, C.; VISMARRA, A.; MANGIA, C.; BONARDI, S.; BRUINI, I.; GENCHI, M.; KRAMER, L.; BRINDANI, F. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 202, p. 54–56, 2015.

CAMARGO, M. E. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 117–118, 1964.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in

pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 910–913, 1988.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: Stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 1997.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75–77, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs — The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009a.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 877–882, 2009b.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2^a ed. Florida: Boca Raton. 2010

DUBEY, J. P.; DESMOND, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Vet. J.**, v. 19, p. 337–339, 1987.

DUBEY, J. P.; GRAHAM, D. H.; SILVA, D. S. da; LEHMANN, T.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. *Toxoplasma gondii* isolates of free-ranging chickens from Rio de Janeiro, Brazil: Mouse mortality, genotype, and oocyst shedding by cats. **Journal of Parasitology**, v. 89, n. 4, p. 851–853, 2003.

DUBEY, J. P.; MURRELL, K. D.; FAYER, R.; SCHAD, G. A. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 1035–1037, 1986.

DUBEY, J. P.; VELMURUGAN, G. V; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H. F. J.; DE OLIVEIRA, L. N.; LEIFER, C. A.; GENNARI, S. M.; BAHIA OLIVEIRA, L. M. G.; SU, C. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 157, p. 299–305, 2008.

GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C. de. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e eqüinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná-Brasil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 91–97, 1999.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; GAMBLE, H. R. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 9–17, 2006.

HUONG, L. T. T.; DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in pigs from Vietnam. **Journal of Parasitology**, v. 93, p. 951–952, 2007.

KIJLSTRA, A.; EISSEN, O. A.; CORNELISSEN, J.; MUNNIKSMA, K.; EIJCK, I.; KORTBEEK, T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, p. 3165–3169, 2004.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1359–1370, out. 2008.

SAMICO-FERNANDES, E. F. T.; SAMICO-FERNANDES, M. F. T.; DE ALBUQUERQUE, P. P. F.; DE ALMEIDA, J. C.; SANTOS, A. de S.; MOTA, A. da R.; DE SOUZA NETO, O. L.; MOTA, R. A. *Toxoplasma gondii* in backyard pigs: seroepidemiology and mouse bioassay. **Acta Parasitologica**, v. 62, p. 466–470, 2017.

STEINPARZER, R.; REISP, K.; GRÜNBERGER, B.; KÖFER, J.; SCHMOLL, F.; SATTLER, T. Comparison of different commercial serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in serum of naturally exposed pigs. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, p. 119–124, 2015.

TSUTSUI, V. S.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; VIEIRA, D. P.; MARANA, E. R. M.; PRUDÊNCIO, L. B.; NAVARRO, I. . Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 30–34, 2007.

VERONESI, F.; RANUCCI, D.; BRANCIARI, R.; MIRAGLIA, D.; MAMMOLI, R.; FIORETTI, D. P. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria Region, Central Italy. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, p. 178–184, 2011.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations.

International Journal for Parasitology, v. 39, p. 895–901, 2009.

YAI, L. E. O.; VIANNA, M. C. B.; SOARES, R. M.; CORTEZ, A.; FREIRE, R. L.; RICHTZENHAIN, L. J.; GENNARI, S. M. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux , 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 227–234, 2003.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que para inviabilizar os cistos de *T. gondii* de carne suína maturada é necessário um período superior a 14 dias e inferior a 21 dias de maturação úmida a 0°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), visto que com 21 dias foi observada a inviabilização dos cistos.

Os cistos de *T. gondii* estão amplamente distribuídos entre os órgãos e cortes comerciais de suínos, demonstrando a importância dessa espécie como fonte de infecção para o homem.

REFERÊNCIAS

- AHNSTRÖM, M. L.; SEYFERT, M.; HUNT, M. C.; JOHNSON, D. E. Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour. **Meat Science**, v. 73, p. 674–679, 2006.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C. F.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D. G. Highly Endemic , Waterborne Toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State , Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.
- BARBOSA, I. R.; HOLANDA, C. M. de C. X.; DE ANDRADE-NETO, V. F. Toxoplasmosis screening and risk factors amongst pregnant females in Natal, northeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, p. 377–382, 2009.
- BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. do N.; SILVA, E. M. K. da; BORTOLIERO, A. L. Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 1, p. 21–25, 1997.
- BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISHER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; MCLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: Implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 564–71. 2005.
- BREWER, S.; NOVAKOFSKI, J. Consumer sensory evaluations of aging effects on beef quality. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 78–82, 2008.
- BUFFOLANO, W.; GILBERT, R. E.; HOLLAND, F. J.; FRATTA, D.; PALUMBO, F.; ADES, A. E. Risk factors for recent toxoplasma infection in pregnant women in Naples. **Epidemiology & Infection**, v. 116, p. 347–351, 1996.
- CAMPBELL, R. E.; HUNT, M. C.; LEVIS, P.; CHAMBERS, E. Dry-aging effects on palatability of beef longissimus muscle. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 196–199, 2001.

CARMO, E. L. do; MORAIS, R. dos A. P. B.; OLIVEIRA, A. S. de; FIGUEREDO, J. E.; FIGUEREDO, M. C.; SILVA, A. V. da; BICHARA, C. N. C.; PÓVOA, M. M. Soroepidemiologia da infecção pelo *Toxoplasma gondii* no Município de Novo Repartimento, Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, p. 79–87, 2016.

COOK, A. J. C.; GILBERT, R. E.; BUFFOLANO, W.; ZUFFEREY, J.; PETERSEN, E.; JENUM, P. A.; FOULON, W.; SEMPRINI, A. E. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. **BMJ**, v. 321, p. 142–147, 2000.

DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; RUFFOLO, B. B.; BUGNI, F. M.; CASTRO, M. V. de; FREIRE, R. L. *Toxoplasma gondii* in fresh pork sausage and soroprevalence in butchers from factories in Londrina, Paraná State, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical São Paulo**, v. 47, n. 4, p. 185–189, 2005.

DUBEY, J. P. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 910–913, 1988.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in pigs — The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 164, p. 89–103, 2009.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2^a ed. Florida: Boca Raton. 2010.

DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; ROZEBOOM, D. W.; RAJENDRAN, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; SU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 14–18, 2012a.

DUBEY, J. P.; KOTULA, A. W.; SHARAR, A.; ANDREWS, C. D.; LINDSAY, D. S. Effect of high temperature on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Parasitology**, v. 76, n. 2, p. 201–204, 1990.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1375–424, 2012b.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structure of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267–299., 1998.

DUBEY, J. P.; THAYER, D. W. Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. **The Journal of Parasitology**, v. 80, n. 5, p. 764–767, 1994.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; MACHADO, R. Z.; NAVARRO, I. T. *Toxoplasma gondii*: Detection by mouse bioassay, histopathology, and polymerase chain reaction in tissues from experimentally infected pigs. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 267–271, 2006.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; GAMBLE, H. R. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. **Veterinary Parasitology**, v. 141, p. 9–17, 2006.

HILL, D. E.; SREEKUMAR, C.; GAMBLE, H. R.; DUBEY, J. P. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2230–2233, 2004.

HOUBAK, M. B.; ERTBJERG, P.; THERKILDSEN, M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. **Meat Science**, v. 79, p. 77–85, 2008.

HUFF-LONERGAN, E.; LONERGAN, S. M. New frontiers in understanding drip loss in pork : recent insights on the role of postmortem muscle biochemistry. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 1, p. 19–26, 2007.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of postmortem muscle - lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat science**, v. 86, p. 184–95, 2010.

KIJLSTRA, A.; JONGERT, E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1359–1370, out. 2008.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the

calpain system. **Meat science**, v. 74, p. 34–43, 2006.

KOTULA, A. W.; DUBEY, J. P.; SHARAR, A. K.; ANDREWS, C. D.; SHEN, S. K.; LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687–690, 1991.

LUNDÉN, A.; UGGLA, A. Infectivity of *Toxoplasma gondii* in mutton following curing, smoking, freezing or microwave cooking. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, n. 3–4, p. 357–363, 1992.

MAIA, L. P.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, C.; OLIVEIRA, K. R. de; NOMELINE, Q. S. S.; AIDAR, F. L. de M.; FERREIRA, G. L. S. Soroprevalência de toxoplasmose na região do Pontal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, p. 457–464, 2012.

MASUR, H.; JONES, T. C.; LEMPERT, J. A.; CHERUBINI, T. D. Outbreak of Toxoplasmosis in a Family and Documentation of Acquired Retinochoroiditis. **The American Journal of Medicine**, v. 64, p. 396–402, 1978.

NEUMAYEROVÁ, H.; JURÁNKOVÁ, J.; SALÁKOVÁ, A.; GALLAS, L.; KOVAŘČÍK, K.; KOUDELA, B. Survival of experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in vacuum packed goat meat and dry fermented goat meat sausages. **Food Microbiology**, v. 39, p. 47–52, 2014.

NICOLLE, M.; MANCEAUX, I. Sur une infection à corps de Leishmann (organismes voisins) du gondi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances, Paris.**, v. 147, p. 763–766, 1908.

NOWAK, D. Enzymes in tenderization of meat - The system of calpains and other systems - a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 61, p. 231–237, 2011.

O'HALLORAN, G. R. O.; TROY, D. J.; BUCKLEYB, D. J.; REVILLE, W. J. The role of endogenous proteases in the tenderisation of fast glycolysing muscle. **Meat Science**, v. 47, n. 3/4, p. 187–210, 1997.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M. A. Revisiting the conversion of muscle into meat and

the underlying mechanisms. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 44–58, 2006.

POTT, S.; KOETHE, M.; BANGOURA, B.; ZOLLER, B.; DAUGSCHIES, A.; STRAUBINGER, R. K.; FEHLHABER, K.; LUDEWIG, M. Effects of pH, sodium chloride and curing salt on the Infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysta. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 6, p. 1056–1061, 2013.

PUGA, D. M. U.; CONTRERAS, C. J. C.; TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps brachii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 88–96, 1999.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parassita de conigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'una malattia che ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. Nota preliminare. **Revista Sociedade Scientifica São Paulo**, v. 3, p. 109–112, 1908.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000.

TSUTSUI, V. S.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; VIEIRA, D. P.; MARANA, E. R. M.; PRUDÊNCIO, L. B.; NAVARRO, I. . Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and mouse bioassay in commercial cuts of pork from experimentally infected pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 30–34, 2007.

WARNEKULASURIYA, M. R.; JOHNSON, J. D.; HOLLIMAN, R. E. Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 211–215, 1998.

WARREN, K. E.; KASTNER, C. L. A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef strip loins. **Journal of Muscle Foods**, v. 3, n. 2, p. 151–157, 1992.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 895–901, 2009.

ZEOLA, N. M. B. L.; SOUZA, P. A. de; SOUZA, H. B. A. de; SILVA-SOBRINHO, A. G. da. Parâmetros qualitativos da carne ovina: um enfoque à maturação e

marinação. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 215–224, 2007.