

YARA SOUZA CLEMES

**Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização
de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos
experimentalmente infectados**

São Paulo

2022

YARA SOUZA CLEMES

**Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização
de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos
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

Orientador:

Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena

São Paulo

2022

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4183
FMVZ

Clemes, Yara Souza
Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados / Yara Souza Clemes. – 2022.
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Dra. Hilda Fatima de Jesus Pena.

1. Toxoplasmose. 2. Carne suína. 3. Infectividade. 4. Isolamento. 5. Bioensaio. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba CRB-8 7070, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "REFINAMENTO DO PROCESSO DE MATURAÇÃO ÚMIDA PARA INVIABILIZAÇÃO DE CISTOS DE *Toxoplasma gondii* EM LOMBOS DE SUÍNOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS.", protocolada sob o CEUA nº 4180200319 (ID 006713), sob a responsabilidade de **Hilda Fátima de Jesus Pena** e equipe; *Yara Souza Clemes*; *Bruna Farias Alves* - 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 02/07/2019.

We certify that the proposal "REFINEMENT OF VACUUM PACKED DRY-AGEING FOR THE NON-VIABILITY OF *Toxoplasma gondii* TISSUE CYSTS IN PORK LOINS OF EXPERIMENTALLY INFECTED PIGS.", utilizing 695 Heterogenics mice (males and females), 1 Cats (males and females), 7 Swines (7 females), protocol number CEUA 4180200319 (ID 006713), under the responsibility of **Hilda Fátima de Jesus Pena** and team; *Yara Souza Clemes*; *Bruna Farias Alves* - 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 07/02/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 09/2019 a 09/2021

Área: [Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal](#)

Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	30 a 40 dias	N:	695
Linhagem:	Swiss			Peso:	15 a 30 g		
Origem:	Animais provenientes de doação espontânea						
Espécie:	Gatos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 12 meses	N:	1
Linhagem:	SRD			Peso:	350 a 2500 g		
Origem:	Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga						
Espécie:	Suínos	sexo:	Fêmeas	idade:	80 a 100 dias	N:	7
Linhagem:	Landrace/Duroc			Peso:	25 a 40 kg		

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus São Paulo e Pirassununga

Comentário da CEUA: O projeto foi reformulado e modificações foram feitas no número de animais de cada espécie utilizada. O número de camundongos que serão utilizados foi modificado para 695, e o responsável informa que como os animais serão agora adquiridos de estabelecimento comercial, as notas de compra dos camundongos assim como dos suínos serão encaminhadas assim que os animais forem adquiridos. O número de gatos usado foi reduzido para apenas 1 (um) e foi informado que será adquirido por doação em ONG. Assim, não vejo impedimento para aceitação mas saliento a necessidade de apresentação das notas de compra dos suínos camundongos assim como termo de doação do gato no primeiro relatório.

São Paulo, 06 de janeiro de 2021



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

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

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CLEMES, Yara Souza

Título: **Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos 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 obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à maior guerreira e maior exemplo
que eu tenho na minha vida, minha mãe.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria, primeiramente, de agradecer a Deus e aos orixás que me permitiram a oportunidade de realizar algo tão incrível.

Ao meu amigo Marcos que me apresentou ao mundo da ciência e participou diretamente da minha formação profissional, abrindo portas e mais portas para o meu sucesso.

A minha amiga Ana, quem eu quero levar pra sempre comigo por onde for, por todo companheirismo, conselhos, ensinamentos, colo para chorar e motivos para dar risada. Por todas as noites que ficamos até de madrugada trabalhando neste projeto e ela esteve do meu lado sem hesitar.

Minha querida amiga Daniela que foi uma surpresa incrível que apareceu no final do projeto e um pilar importantíssimo para conclusão dele. Por toda ajuda, companheirismo e sintonia.

Meu amigo Herbert, que me acompanhou em coletas, que me acolheu em diversas situações e abraçou o projeto comigo.

Minha amiga Bruna que com toda calma e paciência sempre esteve disponível para me ajudar.

Ao querido José Roberto (Ni) que auxiliou com os cuidados dos suínos em Pirassununga, por toda sua bondade e disponibilidade em ajudar sempre com um sorriso no rosto.

Ao querido Danival por todo apoio no processo e por ter se tornado com grande amigo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo, também pelo auxílio com os animais alojados no Campus Pirassununga.

Aos colegas do VPS: Carol, Jaciara, Ryan e Barbara, por todos os cafezinhos e momentos bons.

E por fim, a minha orientadora Hilda, a quem eu não tenho palavras para agradecer, por todo apoio, ensinamentos, orientações e compreensão, por me acolher e segurar minha mão em um dos momentos mais difíceis que eu já passei.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo consentimento da bolsa de mestrado no período de abril a setembro de 2019.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo consentimento da bolsa de mestrado no período de outubro de 2019 a junho de 2021 (processo FAPESP 2019/15962-9).

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”
(Marthin Luther King)

RESUMO

CLEMES, Y.S. **Refinamento do processo de maturação úmida para inviabilização de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados**. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A toxoplasmose é uma doença de importância zoonótica causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. As duas principais vias de transmissão de *T. gondii* para o homem são a ingestão de oocistos esporulados e a ingestão de carnes cruas ou malcozidas que contenham cistos teciduais viáveis do agente. O processo de maturação úmida poder ser um meio de controle da toxoplasmose adquirida por ingestão de carnes. O objetivo deste estudo foi o refinamento do processo de maturação úmida na inviabilização de cistos de *T. gondii* em cortes de lombos (*m. longissimus*) de suínos experimentalmente infectados. Seis suínos com aproximadamente 90 dias de idade e soronegativos para *T. gondii* (título < 64 na Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI) foram infectados, via oral, com 3×10^3 oocistos do isolado TgCkBr57 de *T. gondii*. Os oocistos foram obtidos após reativação do isolado em camundongos e infecção, via oral, de um gato com idade aproximada de cinco meses e soronegativo para *T. gondii* (título < 16 na RIFI). Um suíno soronegativo foi mantido como controle durante todo o experimento. Os sete suínos foram acompanhados, semanalmente, para anticorpos anti-*T. gondii* por meio da RIFI durante oito semanas. No abate (suínos com 150 dias e 80kg, aproximadamente), as carcaças dos seis suínos foram divididas em seis pares. Após a separação dos cortes, os lombos esquerdos foram embalados a vácuo e submetidos ao processo de maturação úmida por 16, 18 ou 21 dias (dois lombos por período) em câmara refrigerada (-1 a 0°C). Todos os lombos, maturados e não-maturados, foram submetidos ao processo de digestão péptica de tecidos e bioensaio em camundongos (300 camundongos para lombos maturados e 300 para lombos não-maturados), em seus respectivos períodos, para a observação da infecção por *T. gondii*. Diafragma e língua de todos os suínos também foram colhidos no abate para o bioensaio em camundongos (10 camundongos por suíno), como controle da infecção. Os camundongos eram acompanhados diariamente para observação de sinais de toxoplasmose, quando eram eutanasiados e examinados

para a presença de taquizoítas e/ou cistos de *T. gondii* nos seus tecidos. Animais sobreviventes por seis semanas pós-inoculação eram eutanasiados e examinados para a presença de *T. gondii*. A soroconversão, com a presença de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*, foi observada nos seis suínos infectados. O número de camundongos infectados com os lombos maturados por 16 dias (69/100) foi próximo aos respectivos lombos não-maturados (80/100); este número foi menor nos grupos inoculados com lombos maturados por 18 dias (28/100), em relação ao respectivo grupo não-maturado (73/100), sugerindo uma diminuição do número de cistos com 18 dias de maturação. Não houve infecção dos camundongos inoculados com lombos maturados por 21 dias (0/100), enquanto no grupo não-maturado respectivo foi 68/100 de infectados. O presente estudo não permitiu o refinamento do processo de maturação úmida para lombos suínos usando os períodos de 16 e 18 dias, mas confirmou a inviabilização de cistos de *T. gondii* no período de 21 dias de maturação úmida nas condições experimentais apresentadas.

Palavras-chave: Toxoplasmose. Carne suína. Infectividade. Isolamento. Bioensaio.

ABSTRACT

CLEMES, Y.S. **Refinement of vacuum-packed dry ageing for the non-viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loins of experimentally infected pigs.**

2022. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Toxoplasmosis is a disease of zoonotic importance caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*. The two main routes of transmission of *T. gondii* to humans are the ingestion of sporulated oocysts and the ingestion of raw or undercooked meat that contain viable tissue cysts of the agent. The dry ageing process can be a means of controlling toxoplasmosis acquired through meat ingestion. The objective of this study was the refinement of the dry ageing process in the non-viability of *T. gondii* cysts in cuts of loin (m. *longissimus*) of experimentally infected pigs. Six pigs with approximately 90 days of age and seronegative for *T. gondii* (titer < 64 by Indirect Fluorescent Antibody TEST – IFAT) were orally infected with 3×10^3 oocysts of the *T. gondii* isolate TgCkBr57. Oocysts were obtained after reactivation of the isolate in mice and oral infection of a cat aged approximately five months and seronegative for *T. gondii* (titer < 16 by IFAT). One seronegative swine was maintained as a control throughout the experiment. The seven pigs were followed up weekly for anti-*T. gondii* antibodies through RIFI for eight weeks. At slaughter (swine aged 150 days and weighing approximately 80 kg), the carcasses of the six pigs were divided into six pairs. After separation of the cuts, the left loins were vacuum packed and submitted to the dry ageing process for 16, 18 or 21 days (two loins per period) in a refrigerated chamber (-1 to 0°C). All loins, aged and non-aged, were submitted to the process of peptic digestion of tissues and bioassay in mice (300 mice for aged loins and 300 for non-aged loins), in their respective periods, to observe the infection by *T. gondii*. Diaphragm and tongue of all pigs were also collected at slaughter for the mouse bioassay (10 mice per pig) as an infection control. The mice were monitored daily for signs of toxoplasmosis, when they were euthanized and examined for the presence of tachyzoites and/or *T. gondii* cysts in their tissues. Animals surviving for six weeks post-inoculation were euthanized and examined for the presence of *T. gondii*. Seroconversion was observed in the six infected pigs, with the presence of IgM and IgG anti-*T. gondii* antibodies. The number of mice infected with loins aged for 16 days

(69/100) was close to the respective non-aged loins (80/100); this number was lower in the groups inoculated with loins aged for 18 days (28/100), in relation to the respective non-aged group (73/100), suggesting a decrease in the number of cysts with 18 days of dry ageing. There was no infection in mice inoculated with loins aged for 21 days (0/100), while in the respective non-aged group there was 68/100 infected. The present study did not allow the refinement of the dry ageing process for swine loins using the periods of 16 and 18 days but confirmed the non-viability of *T. gondii* cysts with 21 days of dry ageing vacuum-packed pork under the experimental conditions presented.

Keywords: Toxoplasmosis. Pork. Infectivity. Isolation. Bioassay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inoculação oral de oocistos do isolado TgCkBr57 de <i>Toxoplasma gondii</i> em suíno experimental.....	26
Figura 2 – Fluxograma do estudo de infectividade de cistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em lombos de suínos experimentalmente infectados submetidos ao processo de maturação úmida utilizando três períodos de maturação (16, 18 e 21 dias).....	28
Figura 3 – Títulos de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos suínos experimentalmente infectados, segundo a semana pós-infecção, obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Excreção fecal de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> pelo felino, de acordo com o dia pós-inoculação.....	33
Tabela 2 – Número de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> excretados pelo felino experimentalmente infectado.....	34
Tabela 3 – Títulos de anticorpos IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> do felino experimentalmente infectado obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta, segundo a semana pós-inoculação.....	36
Tabela 4 – Títulos de anticorpos IgM e IgG anti- <i>Toxoplasma gondii</i> dos suínos experimentalmente infectados obtidos por meio Reação de Imunofluorescência Indireta, segundo a semana pós-infecção.....	36
Tabela 5 – Temperaturas máxima e mínima da câmara fria segundo os dias de permanência dos lombos suínos.....	38
Tabela 6 – Resultados obtidos no bioensaio em camundongos, após inoculação de homogenados de lombos de suínos experimentalmente infectados com <i>Toxoplasma gondii</i> , submetidos a diferentes tempos de maturação úmida.....	40

Sumário

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Reativação do isolado TgCkBr57 de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
3.2	Teste de Aglutinação Modificado dos soros de camundongos	22
3.3	Infecção experimental do felino para obtenção dos oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	23
3.4	Contagem de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> excretados pelo felino	24
3.5	Reação de Imunofluorescência Indireta dos soros do felino	24
3.6	Teste de infectividade dos oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos	25
3.7	Preparação do inóculo de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> para os suínos	25
3.8	Inoculação oral dos suínos com oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	25
3.9	Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos suínos	26
3.10	Delineamento experimental	27
3.11	Maturação dos cortes de lombo (<i>m. longissimus</i>)	29
3.12	Bioensaio em camundongos	29
3.12.1	Digestão péptica dos tecidos	29
3.12.2	Isolamento de <i>Toxoplasma gondii</i>	30
3.13	Análise Estatística	30
3.14	Conduta Ética	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Reativação do isolado TgCkBr57 de <i>Toxoplasma gondii</i>	32
4.2	Infecção experimental do felino para obtenção dos oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
4.3	Contagem de oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i>	34
4.4	Teste de infectividade dos oocistos de <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongos	35
4.5	Reação de imunofluorescência indireta dos soros do felino	35
4.6	Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos suínos	36
4.7	Maturação dos cortes de lombo (<i>m. longissimus</i>)	37
4	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose cosmopolita, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, e caracterizada como uma doença parasitária de mamíferos e aves que afeta principalmente o sistema nervoso central e o sistema reprodutor, causando importantes alterações neonatais, lesões oculares, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais e alterações psicomotoras, tornando a infecção primária na gestante e, conseqüentemente, a infecção do feto via transplacentária, o aspecto mais grave da toxoplasmose humana (LUCAS et al., 1998). No entanto, a maioria das infecções são inaparentes ou latentes (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

Historicamente, a presença de um parasita intracelular foi relatada por Nicolle e Manceaux no baço e fígado de um roedor (*Ctenodactylus gundi*) no norte da África, no início do século XX (1908). Esses autores acreditavam que se tratava de uma forma particular de *Leishmania* e o denominaram *Leishmania gondii*. Também, em 1908, no Brasil, Splendore observou o mesmo parasita em coelho, e o comparou com o agente da leishmaniose visceral. Em 1909, os primeiros autores citados constataram que seria um parasita novo, e foi criado o gênero *Toxoplasma* e a espécie *T. gondii* (NICOLLE; MANCEAUX, 1909).

Os gatos, incluindo Felidae selvagens, são os únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii*, desempenhando papel fundamental na epidemiologia da toxoplasmose, pois apenas este grupo de animais pode eliminar oocistos do parasita nas fezes. Oocistos são as formas resultantes da fase sexuada do ciclo, que dependem das condições climáticas (temperatura e umidade) para a esporulação no meio ambiente, e que podem contaminar a água e os alimentos. Os outros animais têm papel de hospedeiros intermediários, transmitindo a protozoonose quando sua carne serve para alimentação, ou por via congênita (MILLAR et al., 2008).

A toxoplasmose adquire importância na produção animal, principalmente, porque os animais infectados podem servir como fonte de infecção ao homem, além de causar danos diretos aos animais de interesse econômico.

Em seu ciclo biológico, *T. gondii* utiliza três meios primários para sua difusão: a transmissão transplacentária por meio de taquizoítas, a transmissão por ingestão de tecidos animais com cistos infectantes (contendo bradizoítas), e água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados (contendo esporozoítas). As duas vias

principais de transmissão de *T. gondii* para o homem são a ingestão de oocistos esporulados e a ingestão de carnes cruas ou malcozidas que contenham cistos teciduais viáveis do agente (DUBEY, 2010).

O consumo de carne mal cozida ou crua é considerado um importante fator de risco para a infecção, e o tipo de carne de maior risco varia de acordo com a situação de cada região, levando em conta a taxa de consumo e a soroprevalência em cada espécie animal estudada (COOK et al., 2000). As preferências alimentares regionais e culturais também desempenham um papel relevante entre os fatores de risco. Dentre os animais domésticos utilizados para o consumo humano, algumas espécies se destacam como fonte de infecção, sendo, dentre esses animais, as carnes de ovinos, caprinos e suínos consideradas as de maior importância.

Os cistos teciduais de *T. gondii* podem permanecer infectantes em carcaças animais refrigeradas entre 1°C e 4°C por mais de três semanas e entre -1°C e -8°C por mais de uma semana (DUBEY, 1988; KOTULA et al., 1991). Estudos experimentais já comprovaram que os cistos podem permanecer viáveis após aquecimento a 60°C por até 4 minutos, ou a 50°C por até 10 minutos. Tais dados mostram que alguns cistos podem resistir ao processo de cozimento da carne, principalmente se o processo não ocorrer de modo uniforme como, por exemplo, no aquecimento em forno de micro-ondas (DUBEY et al., 1990; LUNDEN; UGGLA, 1992). Em experimento feito por Kotula et al. (1991) usando diferentes tempos de congelamento para testar a viabilidade, os cistos teciduais foram destruídos após a carne ser congelada a -12°C, resultando na recomendação de congelamento dos cortes cárneos por no mínimo dois dias em temperaturas inferiores a -12°C para controle de *T. gondii*.

O processamento por cura de alguns produtos cárneos pode inviabilizar os cistos dependendo da concentração de sal e temperatura de estocagem. 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%), sozinhos ou em combinação, em cérebros obtidos de camundongos infectados experimentalmente com *T. gondii*. Após o processo, os cérebros foram mantidos a 4°C por sete dias e, depois desse período, estes tecidos foram usados para alimentar gatos. Lombos de suínos também foram obtidos de animais experimentalmente infectados, e injetados com as mesmas soluções e mantidos a 4°C por 7, 28 ou 45 dias antes de serem oferecidos a gatos.

As fezes de todos os gatos foram examinadas por 14 dias para observar a presença de oocistos. Os tratamentos das carnes (cérebro de camundongo e lombo suíno) com cloreto de sódio 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 toxoplasmose, tornando os cistos inviáveis já após um dia do tratamento.

Dubey e Thayer, em 1994, com a finalidade de estudar a viabilidade dos cistos teciduais de *T. gondii*, irradiaram material cerebral de camundongos e ratos experimentalmente inoculados com diferentes linhagens do parasita. O material foi testado em bioensaio de camundongos e gatos. Doses a partir de 0,4K Gy tornaram os cistos inviáveis. No mesmo estudo, diferentes temperaturas (-4, 0, 4, 8, 12 e 16°C) foram utilizadas durante a irradiação (0,25K Gy), no entanto, a temperatura não apresentou nenhum efeito na viabilidade dos cistos de *T. gondii*.

Durante o processo de abate dos animais ocorre a acidificação do meio (pH 5,4 – 5,8), pois após a sangria e a interrupção do sistema circulatório do animal, o fluxo de oxigênio e efluxo metabólico são cessados, e como consequência ocorre o acúmulo de ácido láctico. A acidificação do meio promove a liberação de cálcio, formando o complexo actiomiosina, proveniente das ligações entre actina e miosina. A hidrólise destas proteínas, em conjunto com a do citoesqueleto (tinina, desmina e nebulina), amaciam o tecido, pois promovem o rearranjo estrutural do músculo, o que também dá origem a compostos responsáveis pelo sabor e pelo aroma da carne (NOWAK, 2011).

A maturação dos cortes cárneos aumenta a viabilidade comercial do alimento e é uma estratégia utilizada pela indústria, que está sempre em busca de alternativas de melhora e facilidade no manuseio de seus produtos. O processo de maturação é uma oportunidade, não só de melhorar as características organolépticas dos alimentos, pois através de alterações naturais atinge melhor nível de amaciamento e palatabilidade da carne (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; ZEOLA et al., 2007 BREWER; NOVAKOFSKI, 2008), como também uma opção que favorece a conservação dos cortes cárneos, retardando o crescimento de bactérias aeróbicas putrefativas, e favorecendo o crescimento de bactérias lácticas que contribuem diretamente com a conservação do produto por produzirem substâncias antimicrobianas (PUGA; CONTRERAS; TURNBULL, 1999).

Na maturação úmida, a carne é embalada a vácuo em uma embalagem específica com baixa permeabilidade ao vapor, o que a diferencia da maturação a

seco onde a carne não é embalada. Ambas são estocadas em câmara fria com temperatura controlada acima de seu ponto de congelamento (-1,5°C) por período variável. A maturação úmida é a escolha mais comum e presente na indústria por apresentar um maior rendimento dos cortes, além de facilidade no manuseio e transporte (WARREN; KASTNER, 1992; AHNSTROM et al., 2006).

Recentemente, Alves et al. (2020) mostraram que o processo de maturação úmida de lombos suínos, provenientes de animais experimentalmente infectados, foi incapaz de inviabilizar cistos de *T. gondii* com 14 dias de maturação, mas houve a inviabilização com 21 dias de maturação, abrindo uma janela de estudo para o refinamento do processo de maturação como meio de controle da toxoplasmose por ingestão de carnes.

2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo fazer o refinamento do processo de maturação úmida para a inviabilização de cistos teciduais de *T. gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Seis suínos foram infectados experimentalmente com oocistos do isolado TgCkBr57 de *T. gondii*. Este isolado brasileiro obtido de galinha caipira (DUBEY et al., 2002) é classificado, genotipicamente, como Tipo BrII (PENA et al., 2008), que é um genótipo amplamente difundido no território brasileiro. Para a obtenção dos oocistos, inicialmente, foi realizada a reativação do isolado, seguida da infecção experimental de um filhote de felino (*Felis catus domesticus*).

3.1 Reativação do isolado TgCkBr57 de *Toxoplasma gondii*

O isolado TgCkBr57 estava criopreservado em nitrogênio líquido (-196°C). Foi realizado o descongelamento rápido em banho-maria a 37°C, adição de soro fetal bovino para neutralização do dimetilsulfóxido (DMSO), que é utilizado na criopreservação, e centrifugação a 1500 × g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e foi adicionada solução de NaCl 0,85% (solução salina) ao sedimento. A suspensão foi inoculada, via subcutânea, em camundongos da linhagem Swiss, fêmeas e com aproximadamente dois meses de idade.

3.2 Teste de Aglutinação Modificado dos soros de camundongos

A colheita do sangue dos camundongos para obtenção de soro era realizada pelo plexo venoso mandibular, após os camundongos serem contidos fisicamente.

Para a realização do Teste de Aglutinação Modificado - MAT (DUBEY e DESMONTS, 1987), a diluição dos soros dos camundongos foi feita em microplaca (96 poços), usando solução salina tamponada, pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH₂PO₄ 0,0026M; Na₂HPO₄ 0,008M), filtrada em membrana de policarbonato com 0,45µm de porosidade. Em seguida, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítas inteiros fixados em formalina) foram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada, pH 8,95 (NaCl 0,12M; H₃BO₃ 0,05M; NaN₃ 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Essa mistura era então homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço.

Os soros diluídos eram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A placa era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada durante a noite em estufa a 37°C. A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa foi anotada como resultado negativo; um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido foi anotado como positivo.

Os animais com títulos maiores ou iguais a 25 no MAT foram considerados soropositivos (DUBEY, 1997). Em todas as reações, foram usados controles positivo e negativo previamente conhecidos e controle do antígeno.

3.3 Infecção experimental do felino para obtenção dos oocistos de *Toxoplasma gondii*

Um gato, macho, com idade aproximada de cinco meses, sem raça definida e soronegativo para *T. gondii*, com título <16 por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI (CAMARGO, 1964), foi alimentado com os tecidos de um camundongo infectado (cérebro e músculos) para a obtenção de oocistos de *T. gondii*.

O animal foi alojado em gaiola adequada para a espécie e teve suas fezes examinadas, diariamente, quanto à presença de oocistos de *T. gondii* a partir do dia 3 pós-inoculação (p.i.), até ficarem negativas.

A inoculação, via oral, foi realizada oferecendo os tecidos do camundongo positivo como alimento para o gato. A pesquisa de oocistos de *T. gondii* nas fezes foi realizada por meio de uma técnica de flutuação em solução de sacarose (OGASSAWARA et al., 1980). Um grama de fezes era emulsionado em solução de sacarose ($g = 1,203$), a suspensão era coada através de uma gaze e centrifugada em tubos de 15mL a $400 \times g$ por 10 minutos. Uma gota de suspensão fecal do menisco do tubo era microscopicamente examinada para pesquisa de oocistos.

Depois de cinco dias consecutivos de amostras negativas para a presença de oocistos, o animal foi enviado para adoção.

As fezes positivas foram purificadas utilizando o seguinte protocolo: após uma homogeneização inicial com água pura (tipo 3), foram coadas através de coador comum de chá, seguindo-se uma sequência de tamises (65 malhas, 100 malhas, 200 malhas e 400 malhas/ polegada), sempre utilizando água pura para lavagem e aproveitamento máximo do material. O material final coado foi deixado para sedimentação durante a noite em cálices cônicos de 2000mL, e os sedimentos obtidos

foram distribuídos em placas de Petri com ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 2% e mantidos em estufa a 25°C por sete dias para a esporulação dos oocistos. Os oocistos esporulados foram mantidos em H_2SO_4 2% a 4°C, em tubos de 50mL, para serem utilizados, posteriormente, na inoculação dos suínos experimentais.

3.4 Contagem de oocistos de *Toxoplasma gondii* excretados pelo felino

Os oocistos foram contados em câmara de Neubauer, seguindo o protocolo: após a homogeneização, foi separado 0,5g de cada amostra fecal para diluição em 5mL de solução salina; então, foram separadas três alíquotas que eram diluídas 1:10, assim, cada amostra era examinada três vezes e com a média das contagens foi obtido o número de oocistos por grama de fezes e o total por dia.

3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta dos soros do felino

Os soros obtidos do gato foram examinados por meio da RIFI para detecção de anticorpos para *T. gondii* com ponto de corte de 1:16. Os soros foram diluídos em microplaca (96 poços), usando solução de PBS ($NaCl$ 0,731M; KCl 0,027M; NaH_2PO_4 0,105M; KH_2PO_4 0,018M), pH 7,2, e distribuídos em lâminas impregnadas com taquizoítas do agente (linhagem RH de *T. gondii*). As lâminas eram incubadas a 37°C durante 30 minutos, em câmara úmida, seguindo-se três lavagens sucessivas de 10 minutos cada, com PBS, em cubas de vidro.

Em seguida, as lâminas ficavam em temperatura ambiente para secagem e, então, era adicionado o conjugado anti-IgG de gato (SIGMA® F4262), previamente diluído na sua concentração de reatividade ótima em solução de PBS contendo Azul de Evans 0,01%. O processo de incubação e lavagens das lâminas é repetido, porém as lâminas são protegidas da luminosidade. Soros-controle de felinos, positivo e negativo, previamente conhecidos, eram adicionados em todas as lâminas.

A leitura foi realizada em microscópio epifluorescente (OLYMPUS® BX60-FLA, EUA), com objetiva de 40x. As amostras apresentando fluorescência em toda a superfície dos taquizoítas foram consideradas positivas, e a fluorescência apical ou a parcial foi considerada negativa.

3.6 Teste de infectividade dos oocistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos

Previamente à inoculação dos suínos, foi feito o teste de infectividade dos oocistos esporulados, utilizando 20 camundongos.

Os camundongos foram separados em quatro grupos de cinco animais. Os grupos foram inoculados via oral com 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0 oocistos (Grupos 10^3 , 10^2 , 10^1 e 10^0), respectivamente, e acompanhados, diariamente, durante seis semanas para confirmação da infecção por *T. gondii*.

Animais com sintomas compatíveis com toxoplasmose eram eutanasiados e impressões de pulmão e fragmentos de cérebro examinados para a presença de taquizoítas e/ou cistos de *T. gondii*. Animais que sobreviveram até seis semanas p.i. tiveram o sangue colhido para a realização do MAT, e depois foram eutanasiados e examinados da mesma maneira.

A eutanásia era realizada em câmara hermeticamente fechada contendo isoflurano, após os camundongos terem sido sedados com uma combinação de xilazina/quetamina, por via intraperitoneal.

3.7 Preparação do inóculo de oocistos de *Toxoplasma gondii* para os suínos

Para preparar o inóculo dos suínos, inicialmente, houve a remoção do H_2SO_4 2% das suspensões purificadas de oocistos esporulados, por meio de três lavagens sucessivas usando solução salina em centrifugações a $2500 \times g$ por 10 minutos. Uma nova contagem foi feita em câmara de Neubauer para as suspensões de oocistos esporulados obtidos.

3.8 Inoculação oral dos suínos com oocistos de *Toxoplasma gondii*

Sete suínos de aproximadamente 70 dias de idade foram adquiridos e mantidos em baias no campus da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) no município de Pirassununga, SP. Estes animais foram submetidos a testes sorológicos por meio da RIFI para confirmação da soronegatividade a *T. gondii* (títulos <64). Os testes sorológicos foram feitos no ato da aquisição e 15 dias após, confirmando que os animais eram negativos para *T. gondii*.

Com 90 dias de vida, seis suínos receberam, via oral, 3×10^3 oocistos de *T. gondii* do isolado TgCkBr57 (ALVES, 2017) utilizando uma sonda gástrica (Figura 1). Os animais permaneceram alojados em baias até a infecção entrar na fase crônica (aproximadamente oito semanas p.i.), com formação de cistos teciduais do parasita, e, ao mesmo tempo, atingindo a idade e peso de abate (por volta de 150 dias e 80kg). Foram realizadas colheitas semanais de sangue para obtenção do soro e detecção dos níveis de anticorpos anti-*T. gondii* por meio da RIFI. Um suíno soronegativo (título <64 na RIFI), não-inoculado, foi mantido como controle negativo durante todo o período experimental.

Figura 1 – Inoculação oral de oocistos do isolado TgCkBr57 de *Toxoplasma gondii* em suíno experimental.



Fonte: Clemes (2022).

3.9 Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos suínos

Os soros obtidos dos suínos foram examinados por meio da RIFI para detecção de anticorpos para *T. gondii* com ponto de corte de 1:64 para IgG e IgM. O protocolo da RIFI foi descrito, anteriormente, na seção 3.5. Foi utilizado o conjugado anti-IgG de suíno (SIGMA® F4762) ou conjugado anti-IgM de suíno (BETHYL® A100-117F). Soros-controle de suínos, positivo e negativo, previamente conhecidos, foram adicionados em todas as lâminas.

3.10 Delineamento experimental

Os seis suínos infectados foram abatidos, tiveram a carcaça dividida em seis pares (lado direito e lado esquerdo) e coração e diafragma colhidos, separadamente. As carcaças foram encaminhadas para a câmara frigorífica a 4°C por 24 horas para conversão do músculo em carne. Após esse período, foi feita a separação do corte m. *longissimus*, visando a carne do lombo destes animais.

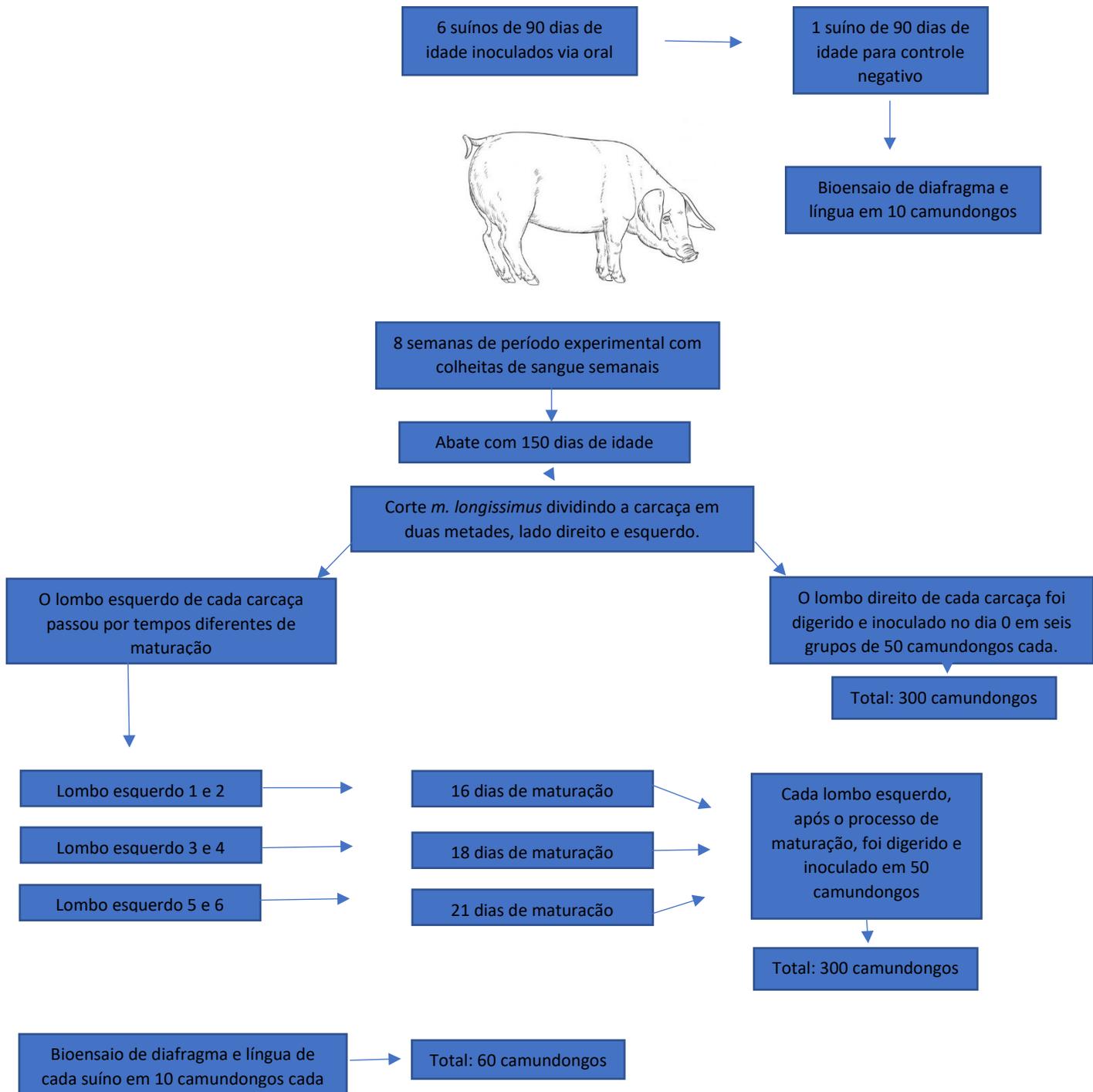
O lombo direito, não-maturado, de cada uma das seis carcaças passou por processo de digestão péptica e foi inoculado no dia 0, respectivamente, para um grupo de 50 camundongos, totalizando 300 camundongos, e o lombo esquerdo (maturado) das seis carcaças passou por tempos diferentes de maturação antes de serem inoculados nos camundongos. Os lombos esquerdos das carcaças 1 e 2 passaram por 16 dias de maturação, os das carcaças 3 e 4 por 18 dias e os das carcaças 5 e 6 por 21 dias. Após a maturação, cada lombo esquerdo foi processado por digestão péptica e inoculado, respectivamente, em grupos de 50 camundongos, totalizando 300 camundongos para esta fase experimental.

O suíno-controle foi abatido com a mesma idade e peso dos animais experimentais, e seus tecidos (diafragma e língua) também foram submetidos ao bioensaio em camundongos.

O processamento dos lombos e tecidos foi realizado nos Laboratórios de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP, São Paulo, SP.

Este delineamento experimental está apresentado em forma de fluxograma na Figura 2.

Figura 2 – Fluxograma do estudo de infectividade de cistos de *Toxoplasma gondii* em lombos de suínos experimentalmente infectados submetidos ao processo de maturação úmida utilizando três períodos de maturação (16, 18 e 21 dias).



Fonte: Clemes (2022).

3.11 Maturação dos cortes de lombo (m. *longissimus*)

As meias-carcaças dos seis suínos infectados foram desossadas após 24h do abate, e os mm. *longissimus* (direito e esquerdo) foram devidamente separados, identificados e utilizados para o bioensaio em camundongos neste experimento. A camada de gordura foi reduzida a uma espessura de até 12 mm. O lombo esquerdo foi destinado ao tratamento de maturação, enquanto o lombo direito foi o controle, sem tratamento. Para a maturação, os cortes foram embalados a vácuo com filme de polietileno e estocados em câmara refrigerada com temperatura controlada (-1 a 0°C) por 16, 18 ou 21 dias.

3.12 Bioensaio em camundongos

O bioensaio para o isolamento de *T. gondii* compreendeu a digestão péptica de tecidos dos suínos, seguida da inoculação, em camundongos, dos homogenados obtidos.

3.12.1 Digestão péptica dos tecidos

O processo de digestão dos tecidos dos suínos foi feito de acordo com o protocolo de Dubey (1998). Como controle da infecção experimental, aproximadamente 50g de diafragma e 50g de língua dos suínos experimentais e do suíno-controle foram, separadamente, cortados em pequenos fragmentos e homogeneizados em solução salina com o auxílio de um homogeneizador doméstico. Ao homogenado, foi acrescida a solução de pepsina ácida (2,6g de pepsina; 5,0g de NaCl, 7,0ml de HCl 12N; 500ml de água destilada). Após incubação a 37°C por uma hora e neutralização com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a 1,2%, o material foi inoculado subcutaneamente em camundongos, correspondendo a 14 bioensaios.

O mesmo protocolo foi seguido para a digestão dos seis lombos maturados e dos seis lombos não-maturados, separadamente, porém usando uma quantidade maior de tecido. Assim, foram utilizados 500g de cada lombo maturado e 500g de cada lombo não-maturado para o processo de digestão. Da mesma maneira, após a neutralização dos homogenados com NaHCO₃ a 1,2%, o material era inoculado em camundongos, neste caso correspondendo a 12 bioensaios no total.

3.12.2 Isolamento de *Toxoplasma gondii*

Para o isolamento de *T. gondii*, os bioensaios foram realizados em camundongos da linhagem Swiss, fêmeas, com idade ao redor de dois meses e cada animal era identificado, individualmente, com brinco adequado para a espécie.

Foram inoculados cinco camundongos para cada tecido (diafragma e língua) dos sete suínos, totalizando 70 camundongos, que ficaram divididos em 14 grupos de cinco camundongos/grupo.

Em relação aos lombos, foram inoculados, respectivamente, 12 grupos de 50 camundongos (seis grupos para os lombos maturados e seis grupos para os lombos não-maturados), totalizando 600 camundongos. Os camundongos foram divididos em subgrupos para melhor controle. Os seis lombos não-maturados foram divididos em cinco grupos de 10 animais para cada lombo, e o mesmo procedimento foi feito para o lombo maturado.

Cada camundongo foi inoculado, via subcutânea, com 1,0 a 1,2 mL de cada amostra digerida, e os animais eram observados, diariamente, para a presença de sinais compatíveis com toxoplasmose.

Os camundongos inoculados eram eutanasiados ao apresentarem sintomas da doença e examinados microscopicamente para a pesquisa de *T. gondii* (cistos e/ou taquizoítas) nos tecidos (pulmão e cérebro). Os animais que sobreviveram até seis semanas p.i. foram, primeiramente, examinados para a presença de anticorpos anti-*T. gondii* por meio do MAT, como descrito na seção 3.2, depois eutanasiados e tiveram seus tecidos examinados para a pesquisa de *T. gondii*.

3.13 Análise Estatística

Foi utilizado o teste de chi-quadrado para comparar as proporções de camundongos infectados com os lombos maturados, segundo o tempo de maturação, e com os lombos não-maturados, utilizando um nível de significância de 5%.

A análise estatística foi feita utilizando o programa R versão 4.1.2.

3.14 Conduta Ética

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, Universidade de São Paulo, Brasil (CEUA n. 4180200319).

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estão apresentados nas seções 4.1 a 4.7.

4.1 Reativação do isolado TgCkBr57 de *Toxoplasma gondii*

A primeira tentativa de reativação foi realizada em três passagens. Na primeira passagem, foi feita a inoculação de quatro camundongos. Os camundongos da primeira passagem foram eutanasiados 15 dias p.i. e, após exame microscópico negativo de impressões de pulmão e cérebro, esses órgãos foram macerados e homogeneizados com solução salina e, então, foi feita a segunda passagem em cinco camundongos, via subcutânea.

Os animais da segunda passagem foram eutanasiados no dia 13 p.i. e, no mesmo dia, foi feita a terceira passagem com o homogenado dos órgãos (pulmão e cérebro) em cinco camundongos. Não houve sintomas de toxoplasmose aguda em nenhum dos animais inoculados. Foi feita a colheita de sangue dos animais da terceira passagem, 30 dias p.i. para a realização do MAT, constatando-se que os animais estavam soronegativos (título <25) para *T. gondii*.

Os animais da terceira passagem foram eutanasiados, e não se observaram taquizoítas ou cistos de *T. gondii* nos exames microscópicos de impressões de pulmão e cérebro. Concluiu-se que a amostra descongelada não estava mais viável.

Foi realizada uma segunda tentativa de reativação do isolado TgCkBr57 com outras três amostras (uma de pulmão e duas de cérebro de camundongos) criopreservadas. Estas amostras foram inoculadas em três grupos com dois camundongos cada, sendo: Grupo 1: pulmão; Grupo 2: cérebro e Grupo 3: cérebro.

O Grupo 1 não apresentou sinais da doença, já o Grupo 2 começou a apresentar sinais clínicos 18 dias p.i. e o Grupo 3, 23 dias p.i. Foi feita a eutanásia de um camundongo do Grupo 2, 20 dias p.i., e foi verificada a presença de taquizoítas nos pulmões, confirmando a viabilidade do isolado. A amostra foi reinoculada em um novo grupo de dois camundongos no mesmo dia.

Foi realizada a eutanásia do segundo camundongo do Grupo 2 e de um camundongo do Grupo 3, 28 dias p.i., que apresentavam sinais clínicos da doença, e foi identificada a presença de cistos no cérebro.

Na eutanásia do segundo camundongo do Grupo 3, 33 dias p.i., foi confirmada a cronificação da infecção com a observação de cistos de *T. gondii* no cérebro. Foi decidido utilizar os tecidos deste camundongo para servir de alimento para o felino experimental, uma vez que já havia um animal disponível.

4.2 Infecção experimental do felino para obtenção dos oocistos de *Toxoplasma gondii*

A excreção de oocistos de *T. gondii* começou no dia 4 p.i. e continuou por um período de 18 dias (Tabela 1).

Tabela 1 – Excreção fecal de oocistos de *Toxoplasma gondii* pelo felino, de acordo com o dia pós-inoculação.

<i>DIA PÓS-INOCULAÇÃO</i>	<i>Resultado*</i>
2º	Negativo
4º	POSITIVO
6º	POSITIVO
7º	POSITIVO
8º	POSITIVO
10º	POSITIVO
12º	POSITIVO
13º	POSITIVO
15º	POSITIVO
16º	POSITIVO
18º	POSITIVO
19º	POSITIVO
21º	POSITIVO
22º	Negativo

23°	Negativo
24°	Negativo
25°	Negativo
26°	Negativo

Fonte: Clemes (2022).

Legenda: *exame microscópico após utilizar a técnica coproparasitológica de flutuação em solução de sacarose (Ogassawara et al., 1980).

4.3 Contagem de oocistos de *Toxoplasma gondii*

A contagem de oocistos de *T. gondii* foi realizada em todas as amostras de fezes nas quais houve excreção (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de oocistos de *Toxoplasma gondii* excretados pelo felino experimentalmente infectado.

<i>Dia pós-inoculação</i>	<i>Fezes totais (g)</i>	<i>N. oocistos/g</i>	<i>N. total oocistos/dia</i>
4°	4,64	$2,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$
6°	9,4	$5,9 \times 10^6$	$5,6 \times 10^7$
7°	9,84	$3,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^7$
8°	9,95	$0,9 \times 10^6$	$9,0 \times 10^6$
10°	24,45	$0,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
12°	17,83	$0,4 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$
13°	14,58	$0,25 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
15°	22	$0,33 \times 10^6$	$7,3 \times 10^6$
16°	15,80	$1,25 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$
18°	15,44	1×10^6	$1,5 \times 10^7$
19°	20,34	$0,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$
21°	15,7	$1,25 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$

Fonte: Clemes (2022).

Legenda: g: gramas

4.4 Teste de infectividade dos oocistos de *Toxoplasma gondii* em camundongos

O Grupo 10³ oocistos foi eutanasiado 12 dias p.i. e o Grupo 10² foi eutanasiado 18 dias p.i. por estarem apresentando sintomas respiratórios compatíveis com quadro de toxoplasmose aguda; foram examinados pulmões e cérebro. Foi confirmada, microscopicamente, a presença de taquizoítas de *T. gondii* nos pulmões e não foi observada a presença de cistos no cérebro.

Foi eutanasiado um camundongo do Grupo 10¹, 22 dias p.i., por estar apresentando sinais de anorexia; foram examinados pulmão e cérebro e, na análise microscópica, foi identificada a presença de taquizoítas no pulmão e pequenos cistos de *T. gondii* no cérebro.

Após seis semanas p.i., foi feita a colheita de sangue dos nove animais sobreviventes para análise sorológica utilizando o MAT. Três animais soropositivos foram detectados. Os nove camundongos foram eutanasiados e os cérebros foram analisados microscopicamente, tendo sido detectados cistos em três animais, corroborando a sorologia positiva observada.

Portanto, com o teste de infectividade em camundongos, pôde-se confirmar que os oocistos se encontravam viáveis para a infecção experimental dos suínos.

4.5 Reação de imunofluorescência indireta dos soros do felino

Os resultados da RIFI para anticorpos IgG anti-*T.gondii* do felino experimentalmente infectado estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Títulos de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* do felino experimentalmente infectado obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta, segundo a semana pós-inoculação.

<i>Semana</i>	<i>Título*</i>
<i>pós-inoculação</i>	
1	Negativo
2	Negativo
3	64
4	64

Fonte: Clemes (2022).

Legenda: *título positivo: ≥ 16

4.6 Reação de imunofluorescência indireta dos soros dos suínos

Os soros dos suínos foram colhidos uma vez por semana para o estudo da curva de anticorpos IgM e IgG anti-*T. gondii*.

Observaram-se anticorpos IgM nas semanas 2 e 3 p.i.; em seguida, apenas anticorpos IgG são observados até a semana 8 p.i. (Tabela 4 e Figura 3).

Tabela 4 – Títulos de anticorpos IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* dos suínos experimentalmente infectados obtidos por meio Reação de Imunofluorescência Indireta, segundo a semana pós-infecção.

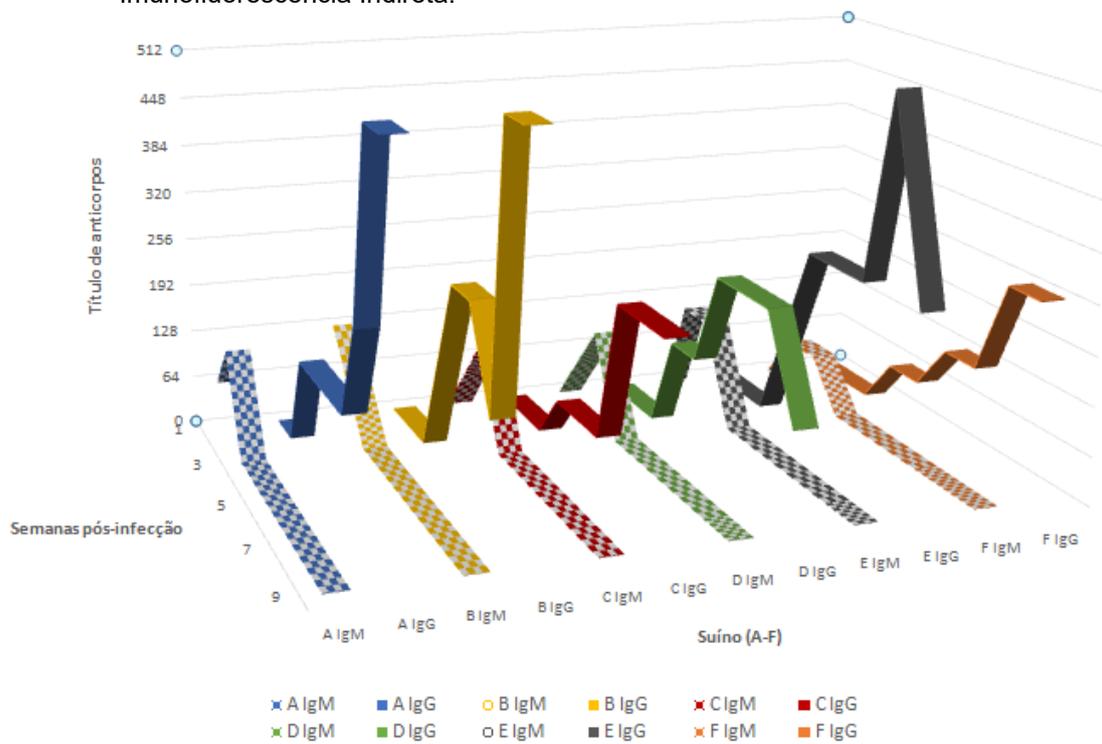
Semana	Suíno A	Suíno B	Suíno C	Suíno D	Suíno E	Suíno F
p.i.	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)	(IgM/IgG)
1	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg	Neg/Neg
2	64/Neg	128/Neg	64/Neg	64/Neg	128/Neg	64/Neg
3	128/Neg	64/Neg	128/Neg	128/Neg	128/Neg	64/Neg
4	Neg/128	Neg/128	Neg/64	Neg/128	Neg/128	Neg/64
5	Neg/128	Neg/256	Neg/64	Neg/128	Neg/256	Neg/64
6	Neg/128	Neg/256	Neg/64	Neg/256	Neg/256	Neg/128
7	Neg/256	Neg/128	Neg/256	Neg/256	Neg/256	Neg/128
8	Neg/512	Neg/512	Neg/256	Neg/256	Neg/512	Neg/256
9	Neg/512	Neg/512	Neg/256	Neg/128	Neg/256	Neg/256

Fonte: Clemes (2022).

Legenda: p.i.: pós-infecção; título positivo: ≥ 64

O suíno-controle manteve-se soronegativo durante todo o período experimental.

Figura 3 – Títulos de anticorpos IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* dos suínos experimentalmente infectados, segundo a semana pós-infecção, obtidos por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta.



Fonte: Clemes (2022).

Legenda: título positivo: ≥ 64

4.7 Maturação dos cortes de lombo (*m. longissimus*)

Na Tabela 5 estão apresentadas as temperaturas máxima e mínima observadas na câmara fria onde os lombos suínos foram colocados para o processo de maturação. A temperatura máxima variou de $-0,3$ a 1°C e a mínima variou de $-0,9$ a $-0,3^{\circ}\text{C}$.

Tabela 5 – Temperaturas máxima e mínima da câmara fria segundo os dias de permanência dos lombos suínos.

<i>Dias na câmara</i>	<i>Temperatura máxima</i>	<i>Temperatura mínima</i>
1	1°C	-0,8°C
2	0°C	-0,6°C
3	-0,3°C	-0,8°C
4	0,3°C	-0,9°C
5	1°C	-0,6°C
6	0°C	-0,3°C
7	0°C	-0,8°C
8	1°C	-0,6°C
9	-0,9°C	-0,7°C
10	0°C	-0,8°C
11	0°C	-0,7°C
12	0°C	-0,6°C
13	1°C	-0,8°C
14	1°C	-0,5°C
15	0,1°C	-0,3°C
16	-0,6°C	-0,8°C
17	0,3°C	-0,7°C
18	0°C	- 0,8°C
19	1°C	- 0,6°C
20	0°C	- 0,2°C
21	1°C	- 0,8°C

Fonte: Clemes (2022).

A média do peso dos lombos suínos analisados nesse estudo foi de 2,5kg. Além da temperatura na câmara fria, foi aferido o pH dos cortes de lombo (nas porções cranial, medial e caudal) antes e após o processo de maturação. A média do pH pós-abate e pré-maturação foi de 5,25 e a de pós-maturação foi de 5,4 não tendo ocorrido variações consideráveis entre animais, porção mensurada ou períodos de maturação, porém estes dados necessitam ainda de tratamento estatístico.

Os resultados obtidos no bioensaio em camundongos, após a inoculação dos homogenados de lombos de suínos experimentalmente infectados com *T. gondii*, submetidos a diferentes tempos de maturação úmida, podem ser visualizados na Tabela 6.

Enquanto o número de camundongos infectados com o lombo maturado por 16 dias (69/100) foi próximo ao respectivo lombo não-maturado (80/100), este número foi menor nos grupos infectados com lombo maturado por 18 dias (28/100), em relação ao respectivo grupo não-maturado (73/100), sugerindo uma diminuição do número de cistos com 18 dias de maturação. Não houve infecção dos camundongos inoculados com lombos maturados por 21 dias (0/100), enquanto no grupo não-maturado respectivo foi 68/100 de infectados.

Na comparação entre as proporções de camundongos infectados com os lombos não-maturados dos suínos A/B, C/D e D/E, não foi observada uma diferença estatística significativa ($p=0,15$), mostrando que, os três grupos de suínos provavelmente tinham um nível de infecção semelhante.

Na comparação entre as proporções de camundongos infectados com lombos maturados de 16 dias e os respectivos lombos não-maturados, não foi observada uma diferença significativa ($p=0,07$); na comparação entre as proporções de camundongos infectados com lombos maturados de 18 dias e os respectivos lombos não-maturados, foi observada uma diferença significativa ($p<0,001$), assim como na comparação entre as proporções de camundongos infectados com lombos maturados de 21 dias e os respectivos lombos não-maturados.

Tabela 6 – Resultados obtidos no bioensaio em camundongos após a inoculação de homogenados de lombos de suínos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*, submetidos a diferentes tempos de maturação úmida.

<i>Suíno</i> (tempo de maturação do lombo)	<i>Diafragma + língua</i> (controle da infecção)*	<i>Lombo não- maturado*</i>	<i>Lombo maturado*</i>
<i>Suíno A (16 dias)</i>	10/10	42/50	37/50
<i>Suíno B (16 dias)</i>	10/10	38/50	32/50
<i>Suíno C (18 dias)</i>	8/10	31/50	15/50
<i>Suíno D (18 dias)</i>	7/10	42/50	13/50
<i>Suíno E (21 dias)</i>	7/10	39/50	0/50
<i>Suíno F (21 dias)</i>	10/10	29/50	0/50
<i>Suíno-controle#</i>	0/10	-	-

Fonte: Cledes (2020).

Legenda: *Número de camundongos infectados/número de camundongos inoculados; #suíno não inoculado.

4 DISCUSSÃO

A toxoplasmose causada pela ingestão de carne suína pode ser um grave problema de saúde pública quando se considera que um suíno infectado, com peso no abate próximo a 100kg, pode render até 600 porções individuais de carne (DUBEY et al., 2012). Desta maneira, a tecnificação da carne utilizando processos que possam diminuir o risco de infecção por *T. gondii* aos seus consumidores, assume um papel relevante na indústria.

No presente estudo, os cistos de *T. gondii* nos cortes de lombos suínos maturados permaneceram viáveis após 16 e 18 dias de maturação úmida. Estes foram os tempos de maturação selecionados para tentar o refinamento do processo de maturação úmida, pois, anteriormente, Alves et al. (2020) haviam demonstrado, por meio de bioensaio em gatos e camundongos, que os cistos permaneciam viáveis com 14 dias de maturação, e eram inviabilizados com 21 dias de maturação (neste caso, utilizaram apenas o bioensaio em camundongos). O tempo de prateleira de um produto é um fator econômico de importância elevada para a indústria, assim, a possibilidade de se conseguir a inviabilização de cistos de *T. gondii* em um período menor de maturação traria benefícios para este setor.

O processo de maturação úmida não tem um período padronizado pela legislação (WARREN; KASTNER, 1992). Trata-se de um processo de alto custo relacionado ao espaço para estocagem dos produtos e à refrigeração. No Brasil, as indústrias têm utilizado um período menor que 14 dias para os produtos cárneos processados, o que não garante a segurança do produto em termos de possibilidade de infecção por *T. gondii*, como observado por Alves et al. (2020) e, mesmo para os períodos de 16 e 18 dias de maturação, como constatado no presente estudo para lombos de suínos experimentalmente infectados.

Quando os períodos de maturação por 16 e 18 dias foram comparados, observou-se que houve uma diferença significativa em relação ao número de camundongos infectados, o que pode sugerir uma diminuição importante de cistos viáveis a partir de 18 dias de maturação, mas ainda persiste o risco em termos de saúde pública. O tempo de maturação de 21 dias foi incluído no presente estudo como um controle para os tempos de 16 e 18 dias e, de fato, os resultados corroboraram Alves et al. (2020) de que este período é capaz de inviabilizar cistos em lombos maturados de suínos experimentalmente infectados. A eficácia de diferentes períodos

na inviabilização de cistos de *T. gondii* também já foi destacada com outros tipos de processamento de carne como na cura de presunto maturado e cru (GENCHI et al., 2017; HERRERO et al., 2017).

Relativamente aos fatores possivelmente envolvidos na inviabilização dos cistos de *T. gondii* durante o processo de maturação úmida, o tempo maior de estocagem pode favorecer o rompimento dos cistos devido a um maior rearranjo estrutural das fibras musculares, e os bradizoítas liberados não suportariam a temperatura baixa da câmara fria. Alves et al. (2020) observaram um papel significativo do pH nos lombos maturados, porém, no presente estudo, não foi possível, até o momento, a análise destes resultados. Sabe-se que há um ligeiro incremento no pH da matriz cárnea após alguns dias de maturação, devido à produção de compostos de Nitrogênio (SALIM et al., 2017).

No presente estudo, os bioensaios dos lombos foram realizados apenas em camundongos, pela dificuldade em manutenção e posterior adoção de gatos. Os gatos seriam o modelo experimental ideal para este tipo de bioensaio, pela maior quantidade de carne que pode ser administrada e, conseqüentemente, maior possibilidade de ingestão de cistos e pela maior sensibilidade, uma vez que são os hospedeiros definitivos do agente (DUBEY, 2010). Para minimizar este fator, optou-se por processar uma quantidade maior de lombo por suíno (500g), ao invés de 300g, e utilizar 50 camundongos por lombo processado, ao invés de 10, como utilizado anteriormente (ALVES et al., 2020). Estas modificações evitaram que fossem encontrados grupos de lombos-controle (não-maturados) sem camundongos infectados, o que dificultaria a interpretação dos resultados com os lombos maturados, além de permitir um resultado mais homogêneo para todos os suínos experimentais, como verificado na comparação das proporções de camundongos infectados nos grupos de lombos não-maturados.

6 CONCLUSÕES

O refinamento do processo de maturação úmida de lombos suínos experimentalmente infectados não foi possível utilizando os períodos de 16 e 18 dias.

O período de maturação úmida de 21 dias inviabiliza cistos de *T. gondii* em lombos suínos experimentalmente infectados.

REFERÊNCIAS

- ALVES, B. F. et al. The impact of dry ageing vacuum-packed pork on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts. **Food Microbiology**, v.86, 2020, 103331.
- 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.
- COOK, A. J. et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 321, n. 7254, p. 142-7, 15 jul. 2000.
- DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 337-9, 1987.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, n. 1, p.75-77, 1998.
- DUBEY, J.P. Tissues cysts tropism in *Toxoplasma gondii*: a comparison of tissue cysts forming in organs of cats, and rodents fed oocysts. **Parasitology**, v.115, n. p. 9-14.1997.
- DUBEY, J.P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton: CRC, 1988.
- DUBEY, J. P.; HILL, D. E.; ROZEBOOM, D. W.; RAJEDRANMC.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O. C. H.; DU, C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 14-18, 2012.
- 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, p.201-204, 1990.
- DUBEY, J.P.; THAYER, D.W. Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. **Journal of Parasitology**, v.80, p.764-

767, 1994.

DUBEY, J.P.; GRAHAM, D.H; BLACKSTON, C.R.; LEHMANN, T.; GENNARI, S.M.; RAGOZO, A.M.A.; NISHI, S.M.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C.H.; HILL, D.E.; THULLIEZ, P. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected findings. **International Journal for Parasitology**, v.32, p.99-105, 2002.

GENCHI, M.; VISMARRA, A.; MANGIA, C.; FACCINIC, S.; VICARIA, N.; RIGAMONTIA, S.; PRATIA, P.; MARINO, A.M.; KRAMER, L.; MASSIMO, F. Lack of viable parasites in cured 'Parma Ham' (PDO), following experimental *Toxoplasma gondii* infection of pigs. **Food Microbiology**, v. 66, p. 157-164, 2017.

Herrero, L.; Gracia, M.J.; Pérez-Arquillué, C.; Lázaro, R.; Herrera, A.; Bayarri, S. *Toxoplasma gondii* in raw and dry-cured ham: the influence of the curing process. **Food Microbiology**. v.65, p. 213-220, 2017.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 41-61, 2005.

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. 54, n.9, p. 687-690, 1991.

KOTULA, A. W. et al. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. 9, p. 687-690, 1991.

LUCAS, S. R. R. et al. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 00-00, 1998.

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

MILLAR, P. R. et al. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 15-18, 2008.

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, 1908.

OGASSAWARA, S.; BENASSI, S.; HAGIWARA, M.K., LARSSON, C.E. *Isospora spp*: estudo sobre a ocorrência na espécie felina na cidade de São Paulo. **Revista de Microbiologia de São Paulo**, v.11, p.126-130, 1980.

PENA, H.F.J.; Soares, R.M.; Ragozo, A.M.A.; Monteiro, R.M.; Yai, L.E.O.; Nishi, S.M.; Gennari, S.M.; 2007. Isolation and molecular detection of *Neospora caninum* from naturally infected sheep from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 61-66, 2007.

PUGA D. M. U.; CONTRERAS, C. J. C.; TURNBULL, M. R. Avaliação do amaciamento de carne bovina de dianteiro (*Triceps branchii*) pelos métodos de maturação, estimulação elétrica, injeção de ácidos e tenderização mecânica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 88-98, 1999.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <https://www.R-project.org/>.

RANUCCI, D.; VERONESI, F.; BRANCIARI, R.; MIRAGLIA, D.; MORETTA, I.; FIORETTI, D. P. Evaluation of an Immunofluorescence Antibody Assay for the Detection of Antibodies Against *Toxoplasma gondii* in Meat Juice Samples from Finishing Pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.1, p. 75-78, 2012.

SALIM, A.P.A.A.; CANTO, A.C.V.C.S.; COSTA-LIMA, B.R.C.; SIMOES, J.S.; PANZENHAGEN, P.H.N.; COSTA, M.P.; FRANCO, R.M.; SILVA, T.J.P.; CONTE-JUNIOR, C.A., 2018. Inhibitory effect of acid concentration, aging, and different packaging on *Escherichia coli* O157:H7 and on color stability of beef. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 42, e13402, 2017.

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.