

RESISTÊNCIA DO TOXOPLASMA GONDII AO CLORETO DE SÓDIO E AOS CONDIMENTOS EM LINGUIÇA DE SUÍNOS¹

Italmar Teodorico Navarro,² Odilon Vidotto,²
Nilson Giraldi³ e Regina Mitsuka³

A finalidade do presente trabalho foi verificar a resistência dos cistos de Toxoplasma gondii ao efeito do sal (cloreto de sódio) e dos condimentos (pimenta-do-reino e alho) em linguiças do tipo frescal, elaboradas com carne de suínos experimentalmente infectados. As linguiças estudadas foram tratadas com 1,25, 2,00 e 2,50% de sal com adição de condimentos, e mantidas sob refrigeração por períodos de 0, 24 e 48 horas, após o que foram as mesmas digeridas artificialmente e o material resultante inoculado em camundongos. Após 42 dias, sacrificaram-se os camundongos sobreviventes e seus soros foram examinados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos anti-T. gondii. Os exames revelaram que, em períodos inferiores a 24 horas, os tratamentos com sal não eliminam o parasito e que somente após 48 horas a ação do sal, nas concentrações de 2,00 e 2,50%, mostrou-se eficiente, inviabilizando o parasito. Os resultados deste experimento mostraram, também, que os condimentos não interferem na viabilidade do T. gondii.

O termo toxoplasmose é utilizado para designar as condições de infecção pelo *Toxoplasma gondii* (1) que acomete tanto os animais como o homem. Trata-se de uma antroponose de distribuição geográfica mundial considerada como sendo a parasitose mais freqüente no homem e, talvez, nos animais homeotermos (2).

A importância da infecção, no âmbito da saúde pública, reside no fato dessa zoonose representar uma causa apreciável de natimortalidade e, principalmente, de morbidade neonatal, com apresentação de lesões

oculares de intensidade variável e alterações cerebrais graves (3).

A ingestão de alimentos contaminados com oocistos e/ou cistos teciduais em produtos de origem animal infectados com o *T. gondii* são as duas maiores causas de infecção humana (4, 5).

Como o consumo de carne crua ou malcozida são formas de transmissão do *T. gondii* para o homem, o grande consumo de linguiças frescas feitas de carne suína pela população brasileira, que em muitas regiões as consome malcozidas e não raro cruas, é causa de grande preocupação. Esta se vê hoje reforçada no Brasil pelo fato de tais linguiças serem processadas artesanalmente — o que

¹ Trabalho desenvolvido na Universidade Estadual de Londrina (U E L), Paraná, com o apoio da Coordenadora de Pesquisa e Pós-Graduação

² Docentes da Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Medicina Veterinária e Prevenção de Patologia Animal. Endereço para correspondência: Italmar Teodorico Navarro, CXP 6001, CCA/DMVPPAZ, 86050, Londrina, Paraná, Brasil.

³ Pós-graduandos, Universidade Estadual de Londrina

certamente contribui para aumentar o risco da doença. Agrava ainda esta preocupação a alta prevalência de títulos sorológicos encontrados nos rebanhos nacionais de suínos (6–10).

A avaliação dos métodos empregados atualmente para a destruição dos cistos de *T. gondii* na carne — congelamento, defumação, salga, fritura, ebulição, etc. (4, 11–14) — é condição básica para o aperfeiçoamento dos processos que, confrontados com as características sócio-econômicas e ecológicas de cada região, possibilitem o controle do *T. gondii* nos produtos de origem animal.

Objetivou-se, neste trabalho, analisar a resistência dos cistos teciduais de *T. gondii* aos condimentos tradicionalmente usados na preparação de linguiças de suínos e a diferentes concentrações de sal esperando-se, desta forma, verificar a viabilidade dos cistos nesse tipo de linguiça e avaliar o potencial de risco de transmissão do parasito para o homem.

MATERIAL E MÉTODOS

Dois suínos (identificados como n.º 1 e n.º 2), ambos com 75 dias de idade, da raça *large white*, obtidos de granjas da região e sorologicamente negativos para *T. gondii* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), foram inoculados com cerca de 1 500 cistos por via oral e 4 500 por via subcutânea. Os cistos inoculados foram obtidos de macerado de cérebro de camundongos previamente inoculados com a amostra "P" (originária de cão pastor). Contaram-se e padronizaram-se os inóculos em câmara de Newbauer. Após a inoculação, os suínos foram mantidos em baias individuais com ração concentrada comercial e água *ad libitum*, com acompanha-

TABELA 1. Relação dos tratamentos e suas respectivas quantidades de sal (NaCl) e adição de condimentos

Tratamento	Sal	Condimentos ^a
A ^b	ausente	ausente
B	ausente	presente
C	1,25%	presente
D	2,00%	presente
E	2,50%	presente

^a 0,3 de alho e 0,4% de pimenta-do-reino

^b Carne moída não embutida controle

mentos diário por exame clínico e semanal por exames para *T. gondii*.

Após o período de observação — 65 dias para o suíno n.º 1 e 122 dias para o n.º 2 — os mesmos foram sacrificados e colhidas amostras de cada um, num total de 2 000 g de tecido muscular (compreendendo diversos cortes da economia animal, usados para embutimento) e 500 g de tecido adiposo. Colheram-se, também, amostras dos cérebros, fígados e baços.

Submeteram-se as amostras colhidas de cada suíno aos cortes tradicionais de frigorífico, para a separação do tecido adiposo. Os recortes de carne utilizados guardaram a proporção preconizada pela formulação do Serviço de Inspeção Federal e pelas formulações artesanais para linguiça tipo frescal, ou seja: 75% de recortes de carne, 10% de carne da cabeça e 15% de toucinho (tecido adiposo). Após trituradas mecanicamente com discos de 4 mm, estas carnes foram divididas em cinco alíquotas de 350 g e tratadas com diferentes concentrações de sal (NaCl) e condimentos (alho comum e pimenta-do-reino) (tabela 1). Para manter a igualdade com as linguiças artesanais, excluiu-se do processamento, o uso de outros sais e condimentos.

Depois de tratadas com sal e condimentos as amostras — 50 g cada — foram embutidas e mantidas sob refrigeração por tempos diferentes (tabela 2), após o que adicionou-se a cada uma delas cinco volumes de uma solução de suco digestivo artificial, segundo fórmula proposta por Jacobs e Melton (15) — 1,6 g de pepsina (com atividade bioló-

TABELA 2. Número e quantidade das amostras (50 g cada) colhidas de cada suíno e tempo de estocagem à temperatura de 10 °C

Tratamento	Tempo de estocagem das amostras a 10 °C, em horas			Total das amostras
	0	24	48	
A	6	6
B	...	3	3	6
C	...	3	3	6
D	...	3	3	6
E	...	3	3	6

gica 1:10 000), 2,5 g de NaCl, 13,5 ml de HCl e água em quantidade suficiente para 500 ml de solução. O homogeneizado foi incubado a 37 °C sob agitação, durante 120 minutos, e depois filtrado em gaze dupla esterilizada.

Os volumes filtrados foram centrifugados a 2 000 rotações por minuto, durante 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante, e o sedimento resuspenso em solução salina (0,9% NaCl), completando 300 ml. Repetiu-se este procedimento três vezes, após o que o sedimento foi resuspenso em 10 ml de solução salina contendo 1 000 unidades por ml de penicilina G e 1 mg/ml de diidroestreptomicina. A suspensão assim obtida foi inoculada, por via intraperitoneal, na dosagem de 2 ml cada, em cinco camundongos albinos *swiss*, fêmeas, livres de *T. gondii*. Paralelamente, inocularam-se camundongos controle com extrato de amostras de cérebro e fígado de cada um dos suínos.

Após um período de observação de 42 dias, os lotes de camundongos foram sangrados e os soros obtidos submetidos à RIFI para pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, considerando-se como positivos os que apresentaram títulos maiores ou iguais a 1:64. O conjugado utilizado para a RIFI foi a IgG anti-camundongo (1:40) (Sigma-Chemical, St. Louis, EUA).

Recolheram-se fragmentos de cérebro, fígado e tecido muscular que, após fixados em formalina a 10%, foram seccionados em cortes de 6 µm e corados por hematoxilina-eosina e examinados ao microscópio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando sacrificados, após 65 dias, o suíno n.º 1 apresentou título de anticorpos anti-*T. gondii* IgG de 1:1024 e o n.º 2 título de 1:4096. Assim, pôde-se determinar que os animais estavam em fase sugestiva da presença de cistos nos tecidos, o que se confirmou pelo isolamento do parasito nas amostras controle. Estes resultados das provas serológicas concordam com outras que isolaram o parasito de suínos com títulos compatíveis de doença crônica (4, 12, 16). O isolamento do parasito nas amostras de cérebro inoculadas em camundongos reforça a positividade dos suínos, o mesmo não ocorrendo com as amostras de fígado (tabela 3).

TABELA 3. Reisolamento de *T. gondii* de camundongos inoculados com macerados de órgãos de suínos infectados com cistos

Suínos	Macerados de cérebro	Macerados de fígado
N.º 1	PsPt	...
N.º 2	Ps	...

Ps Reação de imunofluorescência positiva (maior ou igual a 1:64) em camundongos inoculados com extrato da digestão de carne ou de língua

Pt Presença de taquizoítas de *T. gondii* no exsudato peritoneal dos camundongos inoculados

TABELA 4. Isolamento de *T. gondii* em camundongos inoculados com amostras de carne de linguiça fresca, preparada com carne de suínos experimentalmente infectados, e submetidas a diferentes concentrações de sal e a diferentes tempos de estocagem em geladeira a 10 °C

Suíno	Tratamento									
	A	B		C		D		E		
	0 ^a	24 ^a	48 ^a							
N ^o 1	Ps	Ps	Ps	PsPt	Pt	Ps	...	Ps	...	
	Ps	PsPt	Ps	PsPt	...	Ps	
	Ps	PsPt	Ps	Ps	
N ^o 2	Ps	Ps	Ps	Ps	...	Ps	...	Ps	...	
	Ps	Ps	Ps	Ps	
	Ps	Ps	Ps	Ps	

^a Tempo de estocagem, em horas.

Ps Reação de imunofluorescência indireta para toxoplasmose positiva (maior ou igual a 1:64) em camundongos inoculados com extrato da digestão de carne ou de linguiça.

Pt Presença de taquizoítas de *T. gondii* no exsudato peritoneal dos camundongos inoculados

A Controle (carne moída)

B Linguiça sem sal (NaCl), com condimentos.

C Linguiça com 1,25% de sal e condimentos.

D Linguiça com 2,00% de sal e condimentos.

E Linguiça com 2,50% de sal e condimentos.

Observação: As variáveis testadas foram feitas em triplicata.

Os resultados referentes ao isolamento do *T. gondii* dos tratamentos A, B, C, D e E (carne moída, linguiça sem sal e linguiça com 1,25, 2,00 e 2,50% de sal, e observados por períodos de 24 e 48 horas sob refrigeração, aparecem na tabela 4. Esses resultados permitem observar ser possível isolar o *T. gondii* de todas as amostras dos tratamentos A e B, respectivamente carne moída e linguiça sem sal mas com condimentos, inclusive com recuperação da forma proliferativa do parasito taquizoíta em duas amostras do tratamento B. Pelos achados do tratamento B (linguiça sem sal e com condimentos), constatou-se a resistência dos cistos ao efeito da adição de condimentos (alho comum e pimenta-do-reino) utilizados tanto na fabricação artesanal como na industrial.

Nos tratamentos C, D e E, constituídos de linguiça com diferentes concentrações de sal, houve decréscimo no isolamento à medida que se aumentou a quantidade de sal e o tempo de observação. No tratamento C, diferentemente do observado no tratamento B, a inativação parcial dos cistos ocorreu após 48 horas, e nos tratamentos D e E, já nas primeiras horas após a elaboração. Entretanto, a inativação total dos cistos só ocorreu nos tratamentos D e E, e somente após 48 horas, mostrando ser a ação inativante do sal proporcional à concentração empregada. Estes achados evidenciaram a enérgica ação do sal com 48 horas de atuação. De fato, quanto maior a quantidade de sal empregada, maior a inativação dos cistos em menor espaço de tempo. Os dados obtidos por outros cientistas (11) ao submeterem cistos isolados de *T. gondii*, obtidos de macerado de cérebro de camundongos, a soluções com diferentes concentrações de sal — verificando que tais formas têm boa resistência a concentrações de até 2,10% de sal, durante seis horas e perdendo sua infectividade com 24 horas — reforçam os deste trabalho. Já outro cientista (12) preparou pratos à base de carne

suína e adicionou até 3,0% de sal, obtendo o isolamento do parasito dos pratos, enquanto ainda crus, algumas horas após seu preparo.

Pode-se assim observar que nos tratamentos D e E — onde se manteve, respectivamente, a proporcionalidade de sal das formulações artesanal (caseira) e industrial — verifica-se que, mesmo nas concentrações normalmente usadas para a preparação de linguças de suíno tipo frescal, a atuação do sal mostrou ser eficaz com 48 horas, condição esta que proporciona produtos livres de risco de infecção por *T. gondii*, conseqüentemente inócuos para o consumo humano — mesmo quando consumidos crus ou malcozidos; o mesmo não ocorrendo quando o produto permaneceu sob refrigeração por apenas 24 horas.

Quanto aos resultados de exames histopatológicos de cérebro, fígado, baço e tecido muscular, não se pôde observar a presença de *T. gondii* em nenhuma das amostras. Outros autores (17–19) comentam a falta de especificidade e precisão desta técnica para confirmar a presença de *T. gondii* nos tecidos.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

□ Os condimentos rotineiramente utilizados na elaboração de linguças (pimenta-do-reino e alho, não afetam a sobrevivência do *T. gondii*;

□ a carne suína moída representa um grande potencial de risco de infecção por *T. gondii* para o ser humano;

□ os tratamentos com sal — a que usualmente são submetidas as linguças tipo frescal — não elimina, desses produtos, o potencial de risco de infecção com *T. gondii* para o consumo antes de 24 horas.

□ a ação do sal sobre os cistos de *T. gondii* em linguça fresca de suíno mostrou-se eficaz somente após 48 horas de sua elaboração, em concentrações de 2,0 e 2,5%. Esta condição mostrou-se eficaz no sentido de in-

viabilizar o parasito, permitindo seu emprego como meio de controle, mesmo quando esses tipos de produtos forem consumidos crus ou malcozidos.

REFERÊNCIAS

1. Nicole CL, Manceaux L. Sur le infection a corps de Leisheman (ou organisms neoisenes) du gondii. *C R Acad Sci.* 1909;147–763.
2. Aptl W. *Toxoplasmosis*. Santiago: Universidade do Chile; 1973.
3. Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *Bio-science.* 1973;23:343–352.
4. Dubey JP. A review of *Toxoplasma* in pigs. *Vet Parasitol.* 1986;19:181–223.
5. Dubey JP, Murrell KD, Fayer R, Schad GA. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188(9):1035–1037.
6. Schenk MAA, Lima JD, Vianna FC. Frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em Belo Horizonte, MG. *Arq Esc Vet UFMG.* 1976;28(3):261–266.
7. Vidotto O, Navarro IT, Moco CA, Nishimura MFC, Pincelli CA. Prevalência do *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouro do norte do Paraná. Encontro de Pesquisas Veterinárias, 2. 20 a 24 de outubro de 1986. Londrina, Paraná, Brasil.
8. Amaral VJ, Santos SM, Neto JB, Reboças MM. Levantamento sorológico da toxoplasmose suína latente em alguns municípios do Estado de São Paulo, Brasil. *Biológico.* 1978;4:155–158.
9. Vasconcelos OT, Costa AJ, Ávila FA. Aspectos epidemiológicos da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos. *Científica* Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal. 1979;(nº especial): 83–87.
10. Passos LMF, Lima JD, Figueiredo BL. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em Belo Horizonte, MG. *Arq Bras Med Vet Zool.* 1984;36(6):649–657.

11. Jacobs L, Remington JS, Melton ML. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol*. 1960;46(1):11–21.
 12. Work K. Resistance of *Toxoplasma gondii* encysted in pork. *Acta Path Microb Scand*. 1968;73:85–92.
 13. Fayer R, Dubey JP. Methods of controlling transmission of protozoan parasites from meat to man. *Food Technol*. 1985;39(3):57–60.
 14. Dubey, JP. Toxoplasmosis. *J Am Med Assoc*. 1986;189(2):166–197.
 15. Jacobs L, Melton ML. A procedure for testing meat sample for *Toxoplasma* with preliminary results of a survey of pork and beef sample. *J Parasitol*. 1957;42(2):38–39.
 16. Prickett D, Dressen DW, Waltman WD, Blue JL, Brown J. Correlation of tissue infection and serological finding in pigs fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am J Vet Res*. 1985;46:1132.
 17. Hunter B. Isolated spontaneous *Toxoplasma* abortion in young sow. *Can Vet J*. 1970;20:116.
 18. Vidotto O. Infecção experimental de porcas gestantes com oocistos de *Toxoplasma gondii*. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 1987;39(5):795–814.
 19. Dubey JP, Murrel KD, Fayer R. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs fed oocysts. *Am J Vet Res*. 1984;45(10):1941–1943.
-

SUMMARY

RESISTENCE OF *TOXOPLASMA GONDII* TO SODIUM CHLORIDE AND CONDIMENTS IN PORK SAUSAGE

The aim of this study was to determine the resistance of *Toxoplasma gondii* cysts to salt (sodium chloride) and condiments (black pepper and garlic) in fresh sausages prepared with experimentally infected pork. The sausages were treated with 1.25, 2.00, and 2.50% salt with condiments added, and were refrigerated for 2, 24, and 48 hours, after which they were artificially digested. Mice were then inoculated with the digested matter. After 42 days the surviving mice were sacrificed and

their serum examined using indirect immunofluorescence to detect anti-*T. gondii* antibodies. This examination showed that the treatments with salt over periods of less than 24 hours did not eliminate the parasite, and that only after 48 hours did the salt, at concentrations of 2.00 and 2.50%, effectively kill the parasite. The results of this experiment also showed that the condiments had no effect on the viability of *T. gondii*.