

## Método sencillo para determinar la presencia de *Toxoplasma gondii* (Eucoccidia: Sarcocystidae) en carne

Misael Chinchilla, Liliana Reyes, Olga M. Guerrero y Elizabeth Abrahams.

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, (CIET). Dept. Parasitología, Fac. Microbiología, Universidad de Costa Rica, 2060 Costa Rica.

Recibido 6-II-1997. Corregido 5-IX-1997. Aceptado 10-X-1997.

**Abstract:** Presence of *T. gondii* in meat from several sources was determined by traditional methods and by a new simplified method in which animals are fed meat directly without any previous treatment with artificial gastric fluid. Tissues are ground and the animals ingest them naturally. Determination of *Toxoplasma* in lungs or brain (as well as by specific antibody test), showed no statistically significant differences between both methods.

**Key words:** *Toxoplasma*, epidemiology, diagnosis, meat, transmission, new method.

Desde que Jacobs y Melton (1957) establecieron el método de digestión de tejidos con jugo gástrico artificial para estudiar la presencia de *Toxoplasma gondii*, otros autores han modificado la técnica. Usándola modificada o no, se ha estudiado la prevalencia en carnes de diverso origen (Dubey *et al.* 1986), o para aclarar aspectos relacionados con el desarrollo del parásito en hospederos intermediarios que sirven de alimento para el hombre (Dubey *et al.* 1995, 1996).

A pesar de estos antecedentes, se han realizado estudios con carnes de bovinos, siguiendo la vía natural de la ingestión de la carne por parte de ratones, evitando así procedimientos más laboriosos y de mayor costo. De esos trabajos, al menos uno ya ha sido publicado (Arias *et al.* 1994), lo cual provocó algunas dudas especialmente en cuanto a la metodología antes mencionada, dudas que fueron aclaradas en su oportunidad (Arias *et al.* 1995), aunque las aclaraciones no han sido difundidas ampliamente. Para probar la factibilidad de este método que es más simple y al menos tan eficiente como el tradicional, se

hicieron varios experimentos cuyo resultado se describe aquí.

Se usaron ratones de la cepa NGP de 20 a 25 g de peso, alimentados con un concentrado local y agua *ad libitum*, y la cepa TCR-2 de *T. gondii* (Guerrero *et al.* 1994). Esta cepa se mantiene en el laboratorio en ratones blancos, por pasajes semanales en su fase aguda y mensuales en la fase crónica.

El cerebro y porciones de músculo (5, 1 y 0.5 g) de ratones con infección crónica, comprobada por la presencia de quistes en el cerebro, fueron tratados de acuerdo con el método descrito por Dubey *et al.* (1986). Brevemente, los tejidos se mantienen en contacto con jugo gástrico artificial por 30, 60 o 90 min a 37°C, después de cada período, se filtran por gaza y se lavan por centrifugación a 400 g por 10 min. Se descarta el sobrenadante y el sedimento, resuspendido en solución salina al 0.85% con antibióticos, se inocula intraperitonealmente en cinco ratones. A la par de este proceso tradicional, un grupo de animales fue estudiado de acuerdo al siguiente lineamiento experimental.

Después de dejarles en ayunas por 24 h, grupos de cinco ratones fueron alimentados vía oral con porciones de tejidos de pesos iguales a los sometidos al tratamiento con jugo gástrico. Esos tejidos fueron desmenuzados previamente y colocados en placas de petri, las cuales se ubicaron en las cajas de los animales por el tiempo necesario para ser ingeridos (4hr o menos).

### CUADRO 1

*Supervivencia media de ratones inoculados con tejidos tratados y no tratados con jugo gástrico artificial.*

Tejido	Tiempo de tratamiento (min)			
	0*	30	60	90
<b>Experimento 1</b>				
Musc.-0.5g	30**	29	30	21
Musc.-1g	30	30	30	30
Musc.-5g	25	15	12	9
Cerebro	8	11	20	12
<b>Experimento 2</b>				
Musc.-0.5g	23	21	30	17
Musc.-1g	30	26	26	27
Musc.-5g	30	26	26	22
Cerebro	No se estudió			
<b>Experimento 3</b>				
Musc.-1g	30	23	27	30
Musc.-5g	30	30	27	27
Cerebro	22	17	30	26

\*En este caso los ratones ingirieron la carne directamente.

\*\* Supervivencia en días.

A todos los ratones inoculados, y que murieron antes de 30 días (tiempo límite en todos los experimentos), se les dio seguimiento. La presencia de *T. gondii* se comprobó en los sobrevivientes sacrificándolos; se obtuvo sangre para estudios serológicos y se determinó el número de quistes por gramo de

cerebro (Holst y Chinchilla 1990) en los animales infectados.

Para determinar la validez estadística de los resultados se utilizó la prueba de t student comúnmente usada para un pequeño número de muestras.

### CUADRO 2

*Número de quistes de T.gondii presentes en ratones inoculados con 1 g de músculo infectado con y sin tratamiento con jugo gástrico.*

Tiempo trat.(min.)	Prom.	(ámbito)
<b>Experimento 1</b>		
0*	2350	(804-5413)
30	1461	(1146-2087)
60	4133	(953-10333)
90	5285	(236-16875)
<b>Experimento 2</b>		
0	1744	(316-3214)
30	1735	(621-3286)
60	804	(116-1724)
90	2869	(504-4673)

\*En este caso los ratones ingirieron la carne directamente.

\*\* Quistes por gramo de cerebro de los ratones estudiados después de 30 días.

Como resultado de tres experimentos similares (Cuadro 1), se pudo observar que la supervivencia de los animales alimentados directamente, fue similar de la de aquellos inoculados con los tejidos previamente tratados en la forma tradicional. Además todos los sobrevivientes fueron positivos, independientemente del tratamiento recibido por el inóculo, sea por el hallazgo de quistes del parásito en el cerebro o por la presencia de los anticuerpos correspondientes.

Las diferencias que parecen observarse para 5 g de músculo y el cerebro, especialmente en el primer experimento, no fueron estadísticamente significativas.

Experimentos adicionales para confirmar estos hallazgos arrojaron los mismos resultados.

Puesto que la presencia de quistes de *T. gondii* en el cerebro de los animales es un parámetro que se usa en las infecciones de tipo crónico, se hizo un análisis del número de tales quistes en dos experimentos que presentaron más sobrevivientes. No existe diferencia estadísticamente significativa entre el número de quistes encontrados en animales que ingirieron la carne sin tratamiento y los inoculados con tejido tratado con jugo gástrico artificial durante 30, 60 y 90 min (Cuadro 2). Nótese además que todos los animales sobrevivientes presentaron la infección, independientemente del tratamiento.

El método tradicional para hacer estudios en productos cárnicos ha sido de gran utilidad desde su promulgación (Jacobs y Melton 1957) y continúa usándose regularmente (Dubey *et al.* 1996). En nuestro caso hemos demostrado, con varios experimentos repetidos y cuidadosamente elaborados, que la simple alimentación de animales de laboratorio con los tejidos en estudio, es tan efectiva para determinar la presencia de *T. gondii* como los otros métodos previamente establecidos. Inclusive este método puede ser usado para muestras relativamente grandes, como las de 50 g de tejido que son las que usan Dubey *et al.* (1996) en sus experimentos más recientes. En efecto, empleando entre 5 y 10 ratones, tales cantidades pueden ser analizadas por la simple metodología de infección aquí sugerida.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado en parte por la Vicerrectoría de Investigación (Proyectos # 430-92-904 y # 430-92-905). Los autores agradecen a Eddy Camacho por el cuidado de los animales y la ayuda general en el laboratorio.

## REFERENCIAS

- Arias, M.L., M. Chinchilla, L. Reyes, J. Sabah & O.M. Guerrero. 1994. Determination of *Toxoplasma gondii* in several organs of cattle by carbon immunoassay (CIA) testing. *Vet. Parasitol.* 55: 133-136.
- Arias, M.L., M. Chinchilla, L. Reyes, J. Sabah & O.M. Guerrero. 1995. Determination of *Toxoplasma gondii* in several organs of cattle by carbon immunoassay (CIA) testing. *Vet. Parasitol. Reply* 60: 175-176.
- Dubey, J.P., J.K. Junney, S.K. Shen, O.C.H. Kwok, D.A. Ashfords & P. Thulliez. 1996. Infectivity of low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts to pigs. *J. Parasitol.* 82: 438-443.
- Dubey, J.P., K.D. Murrell, R. Fayer & G.A. Schad. 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *JAVMA* 188: 1035-1037.
- Dubey, J.P., R.M. Weigel, A.M. Siegel, P. Thulliez, U.D. Kitron, M.A. Mitchell, A. Mannelli, N.E. Mateus-Pinilla, S.K. Shen, O.C.H. Kwok & K.S. Todd. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *J. Parasitol.* 81: 723-729.
- Guerrero, O.M., M. Chinchilla, R. Marín, G. Catarinella & A. Castro. 1994. Estudio comparativo de dos cepas de *Toxoplasma gondii*. *Parasitología al Día (Chile)* 15: 97-101.
- Holst, I & M. Chinchilla. 1990. Development and distribution of cysts of an avirulent strain of *Toxoplasma gondii* and the humoral immune response in mice. *Rev. Biol. Trop.* 38: 189-193.
- Jacobs, L., J.S. Remington & M.I. Melton. 1960. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* 46: 23-28.