

Efectos en el desarrollo del metacestodo de *Taenia solium* inducidos por dosis bajas de radiación gamma

Effects induced by low doses of gamma irradiation in the *Taenia solium* metacestode development

Fernando Iván Flores-Pérez* Aline S. de Aluja** José Juan Martínez Maya***

Abstract

In order to control taeniasis, cysticercosis, a study was made to evaluate the effects induced by gamma irradiation, on the *in vitro* evagination and development of *Taenia solium* in hamster intestine. Parasites were obtained from several infected pigs and irradiated with doses of 0.2 and 0.3 kGy; viability of the metacestodes was evaluated by the *in vitro* evagination assay and the inoculation of immunosuppressed golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). The capacity to evaginate *in vitro* decreased ($P = 0.008$) in the metacestodes that were irradiated with 0.3 kGy. Immunosuppressed hamsters that were inoculated orally with the metacestodes irradiated with 0.3 and 0.2 kGy did not develop parasites in their intestine; only scolices were found adhered to the intestinal mucosa. The total amount of scolices obtained from *T. solium* metacestodes irradiated with 0.3 kGy was lower ($P = 0.01$). Based on these results it is proposed that the dose of 0.3 kGy is effective to interrupt the life cycle of *Taenia solium*.

Key words: *TAENIA SOLIUM*; GAMMA IRRADIATION; CONTROL OF TAENIASIS-CYSTICERCOSIS

Resumen

Con el objetivo de controlar la teniasis (cisticercosis) se efectuó este estudio en el que se evaluaron los efectos que induce la radiación gamma en el metacestodo de *Taenia solium* (*T. solium*) en la evaginación *in vitro* y en el desarrollo de *T. solium* en el modelo del hámster. Los parásitos se obtuvieron de varios cerdos infectados y se irradiaron con 0.2 y 0.3 kGy. La viabilidad de los metacestodos se evaluó mediante la prueba de evaginación *in vitro* y la inoculación en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*), previamente inmunodeprimidos. En los metacestodos irradiados con 0.3 kGy disminuyó la capacidad de evaginar *in vitro* ($P = 0.008$). En los hámsteres inmunodeprimidos que se inocularon con metacestodos irradiados con 0.3 y 0.2 kGy no se desarrollaron tenias en sus intestinos, únicamente se observaron escolices adheridos a la mucosa intestinal. La cantidad total de escolices obtenidos de los metacestodos irradiados con 0.3 kGy fue menor ($P = 0.01$). Con base en los presentes resultados se propone que una dosis de 0.3 kGy es útil para inhibir el ciclo parasitario de *T. solium*.

Palabras clave: *TAENIA SOLIUM*, RADIACION GAMMA, CONTROL DE TENIASIS-CISTICERCOSIS.

Recibido el 30 de junio del 2005 y aceptado el 20 de enero de 2006.

*Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campo Experimental de Desarrollo e Investigación Agropecuaria (CEDIA), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 101, Col. Chamilpa, 62210, Cuernavaca, Morelos, México.

**Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Para correspondencia y sobretiros: Fernando Iván Flores Pérez, Tel.: (73) 297046, Correo electrónico: ivanfloreseperez@yahoo.com.mx

Introduction

Food borne diseases (FBD) are a public health problem and are the cause for human suffering as well as economic losses.¹ Nevertheless, the exact magnitude of the worldwide health problems associated with these diseases is unknown, since in some countries proper epidemiological surveillance does not exist.

Taeniasis-cysticercosis caused by *Taenia solium* is a parasitosis that is transmitted by food. The life cycle of the parasite begins when a carrier of a sexually mature gravid taenia passes out into the environment proglottides that contain thousands of eggs that when ingested by swine or humans produce cysticercosis, with the parasite lodged in muscles as well as the brain.^{2,3} When improperly cooked infected pork is consumed, the adult parasite develops in the intestine of the host and thus completes its life cycle.^{2,3}

Neurocysticercosis is the most frequent human cestodiasis. In endemic zones in developing countries, approximately 3% to 6% of the human population suffers from it; this represents approximately 50 million persons, and of these 50 thousand die annually.²

There is not reliable and precise information in relation to the frequency of porcine cysticercosis, due to multiple reasons, amongst these the lack of proper slaughter inspection and clandestine slaughtering of pigs contribute to the existence and permanence of this disease in several countries, including Mexico.⁴⁻⁶ Diagnostic tests used for humans such as ELISA, computerized tomography and magnetic resonance are not routinely used on pigs due to their high costs.⁶⁻⁸

Presence of *T. solium* metacestode is diagnosed in pigs when they are alive, by inspecting the tongue with a 50% to 70% efficacy, and in slaughterhouses through muscle mass inspection of carcasses.^{9,10}

With the objective of interrupting the biological cycle of *T. solium*, alternatives have been proposed such as: improvement of sanitary inspection, general hygiene measures, subject infected meat to proper cooking or freezing.^{10,11} Nevertheless, up until now, it has not been feasible to introduce these methods effectively in rural communities due to the lack of education, extreme poverty, insufficient or non-existent basic services such as: water and electricity supply.

Other highly sophisticated alternatives have been taken into consideration such as: diagnostic tests,^{12,13} pigs' vaccination,¹⁴⁻¹⁷ and creation of transgenic animals that could be resistant to the parasitosis.¹⁸ All these alternatives are limited, since there still is not an effective commercial vaccine, nor a low cost diagnostic test that detects *T. solium* metacestodes in live pigs.

Food irradiation technology has been shown to be a useful tool to inactivate a great variety of path-

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son un problema de salud pública y representan una causa tanto de sufrimiento para el ser humano como de pérdidas económicas.¹ Sin embargo, se desconoce la magnitud exacta de los problemas de salud asociados con estas enfermedades en todo el mundo, ya que en algunos países no existen sistemas de vigilancia epidemiológica adecuados.

La teniasis-cisticercosis causada por *Taenia solium* es una parasitosis que se transmite por medio de alimentos. El ciclo parasitario inicia cuando el portador de una tenia sexualmente grávida libera los proglótidos al ambiente, los cuales contienen miles de huevos que, al ser ingeridos por cerdos o humanos, producen la cisticercosis y se alojan tanto en masas musculares como en el encéfalo.^{2,3} Cuando la carne de cerdo infectada insuficientemente cocida se consume, el parásito adulto se desarrolla en el intestino del huésped y de esta manera se completa el ciclo parasitario.^{2,3}

La neurocisticercosis es la cestodiosis más frecuente en el ser humano y en zonas endémicas existentes en países en vía de desarrollo; aproximadamente 3% a 6% de la población humana padece de ella, esto representa alrededor de 50 millones de personas, de éstas mueren anualmente 50 mil.²

No existe información confiable y certera, respecto de la frecuencia de la cisticercosis porcina, debido a múltiples razones, entre ellas: falta de adecuada inspección sanitaria y el sacrificio clandestino de los cerdos, entre otros factores que contribuyen a la existencia y permanencia de esta enfermedad en varios países, incluido México.⁴⁻⁶ Las pruebas diagnósticas empleadas en el humano como ELISA, tomografía computada y resonancia magnética, no se utilizan de rutina en el cerdo por su alto costo.⁶⁻⁸

En los cerdos, la presencia del metacestodo de *T. solium* se diagnostica cuando aquéllos están vivos, por medio de la inspección en lengua, con eficacia de 50% a 70%, y en los rastros mediante la inspección de masas musculares de la canal.^{9,10}

Con el objetivo de interrumpir el ciclo biológico de *T. solium*, se han propuesto alternativas, como mejorar la inspección sanitaria, observar medidas generales de higiene, someter a la carne infectada a una cocción adecuada o a congelación.^{10,11} Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible introducir estos métodos a la población rural de manera efectiva, debido a la falta de educación, pobreza extrema y nulidad o insuficiencia de servicios básicos, como el suministro de agua y de electricidad.

Se han considerado otras alternativas altamente sofisticadas, como las técnicas diagnósticas,^{12,13} vacunación de cerdos,¹⁴⁻¹⁷ creación de animales transgé-

ogenic agents such as parasites, virus, bacteria and fungi, as well as, to increase shelf half life of diverse products.^{19,20} This physical method has been used to inactivate the *T. solium* metacestode.²¹⁻²³ Gamma irradiation effects induced on the metacestode have been described since 1976,²¹ using *in vitro* evagination and hamster inoculation criteria. Doses have been evaluated from those that may have lethal effects with 7 KGy to those that interrupt the parasite's life cycle with 0.3 KGy.²¹⁻²⁴ Since gamma ray irradiation has a cost that can be considerable in industrial processes, it is necessary to evaluate and compare effects of lower doses in order to make irradiation technology more viable and attractive. The objective of this study was the evaluation of the gamma irradiation effects of 0.2 and 0.3 kGy on the development of the metacestode.

Materials and methods

Twelve pigs naturally infected with the *T. solium* metacestode, were sacrificed in a humane manner with electric clamps. The shoulder blade areas of each animal were removed, the left one was radiated and the right one served as control. Each one of the infected shoulders was placed in a black plastic bag and after that introduced in a cardboard box located on a gyrating base to guarantee that the irradiation dose was applied homogeneously. Irradiation doses that were applied were 0.3 kGy, in seven shoulder blades and 0.2 kGy in five shoulder blades. The sample was placed 40 cm away from the vortex of the radiation source, and at a height of 36 cm from the floor.

The radiation sessions were carried out in the Gammabeam 651 PT Co60, located in the Nuclear Sciences Institute of the National Autonomous University of Mexico. All irradiations were performed at constant dose that was determined by the Frick method. Likewise, the location of the sample and the storage conditions were similar for all the irradiation sessions.

In order to evaluate viability, the *in vitro* evagination test was used, and it consists of depositing in a Petri dish 20 mL of RPMI 1640 culture medium, that contained 25% pig bile. The metacestodes were cultured in this solution at 37°C during 12 hours. At the end of this time, evaginated metacestodes were counted. For this test 40 metacestodes were used, 20 without irradiation (controls) and 20 radiated with 0.2 kGy or with 0.3 kGy, for each pig, except for pig number 12. A total of 20 larvae were used for this pig. Only metacestodes that had the neck completely stretched-out and had motility and a visible scolex were considered as evaginated.²² Hamsters were used with the purpose of making evident the metacestode viability *in vivo*. The hamsters (*Mesocricetus auratus*) were from both sexes, with ages between six and 12

nicos que pudieran ser resistentes a la parasitosis.¹⁸ Todas estas alternativas poseen limitaciones, ya que no existe una vacuna comercial que sea efectiva, ni una prueba diagnóstica de bajo costo que detecte presencia de metacestodos de *T. solium* en cerdos vivos.

Se ha demostrado que la tecnología de irradiación de alimentos es una herramienta útil para inactivar gran variedad de agentes patógenos, como parásitos, virus, bacterias y hongos, así como para incrementar la vida media de anaquel de diversos productos.^{19,20} Este método físico ha sido empleado para inactivar al metacestodo de *T. solium*.²¹⁻²³ Los efectos que la radiación gamma induce en el metacestodo han sido descritos desde 1976,²¹ utilizando los criterios de evaginación *in vitro* y de inoculación en hámster. Se han evaluado dosis cuyos efectos pueden ser letales con 7 KGy hasta interrumpir el ciclo vital del parásito con dosis de 0.3 KGy.²¹⁻²⁴ Dado que la irradiación con rayos gamma tiene un costo, que puede ser considerable en procesos industriales, es necesario valorar y comparar el efecto con dosis menores a fin de hacer más viable y atractiva la tecnología de irradiación. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la radiación gamma de 0.2 y 0.3 kGy sobre el desarrollo del metacestodo.

Material y métodos

Se tomaron 12 cerdos infectados con el metacestodo de *T. solium* de manera natural, que se sacrificaron humanitariamente con pinzas eléctricas. Se removieron las espaldillas de cada animal, la izquierda fue irradiada y la derecha sirvió como testigo. Cada una de las espaldillas infectadas se colocó en una bolsa de plástico negra y, posteriormente, se introdujo en una caja de cartón situada sobre una base giratoria para garantizar que la dosis de radiación fuera homogénea, las dosis de radiación aplicadas fueron de 0.3 kGy, en siete espaldillas, y de 0.2 kGy en cinco espaldillas. La muestra se colocó a 40 cm del vértice de la fuente de radiación y a 36 cm de altura respecto del piso.

Las sesiones de radiación se llevaron a cabo en el Gammabeam 651 PT Co60, localizado en el Instituto de Ciencias Nucleares de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las irradiaciones se realizaron con una dosis constante, que se determinó por el método de Frick. Asimismo, la ubicación de la muestra y las condiciones de almacenamiento fueron similares en todas las sesiones de radiación.

Para evaluar la viabilidad se utilizó la prueba de evaginación *in vitro*, que consiste en depositar en una caja de Petri 20 mL de medio de cultivo RPMI 1640, que contenía 25% de bilis de cerdo, se incubaron los metacestodos en esta solución a 37°C durante 12 horas. Al cabo de este tiempo, se contaron los meta-

weeks old; they were immunosuppressed with 4 mg im of methyl prednisolone.²²⁻²⁶

Eight hamsters were used for each pig. They were divided into two groups, each of four hamsters inoculated orally with five non-irradiated metacestodes (controls), and the other four with five metacestodes radiated with 0.2 kGy in some occasions and with 0.3 kGy in others. All 96 hamsters were humanely slaughtered 21 days after inoculation by means of CO₂ and intestines were taken. The mucosa of each intestine was observed with a stereoscopic microscope, in order to locate and collect the parasites. Only complete metacestodes that were in vesicular state with maternal membrane and vesicular liquid were used for the *in vitro* evagination test, as well as for *in vivo* oral inoculation. The results that were obtained were analyzed by the Chi square test and Wilcoxon range test for paired samples.

Results

Forty non-irradiated metacestodes were used for each evagination assay, and these were the controls and 40 metacestodes radiated with 0.2 kGy and 40 radiated with 0.3 kGy were used.

The amount of metacestodes radiated with 0.2 and 0.3 kGy and controls that evaginated, obtained from twelve pigs is shown on Table 1. The proportion of evaginated metacestodes in the control group (non-irradiated) was higher (40.65%), in comparison with the ones radiated with 0.3 kGy (31.075%) ($P = 0.008$). When the control group was compared with the metacestodes radiated with 0.2 kGy, no differences were found ($P = 0.59$).

Only scolices were found, when the intestines were inspected of the hamsters that were inoculated with metacestodes radiated with 0.3 kGy and 0.2 kGy, at 21 days post-inoculation (Figure 1). Taenias were obtained from the ones inoculated with non-irradiated *T. solium* metacestodes (Table 2 and Figure 2).

In the radiated group, the maximum number of scolices that were obtained was four in a hamster that

cestodos evaginados. Para esta prueba se destinaron 40 metacestodos, 20 sin irradiar (testigos) y 20 irradiados con 0.2 kGy o con 0.3 kGy, por cada cerdo, excepto en el cerdo 12, para el que se emplearon 20 larvas en total. Sólo se consideraron como evaginados los metacestodos que tenían el cuello completamente distendido y que presentaban motilidad y el escolex visible.²² Con la finalidad de evidenciar la viabilidad de los metacestodos *in vivo*, se utilizaron hámsteres (*Mesocricetus auratus*) de distintos sexos, con edad de seis a 12 semanas, que fueron inmunodeprimidos con 4 mg de metilprednisolona im.²²⁻²⁶

Para cada cerdo se emplearon ocho hámsteres, que se dividieron en dos grupos cada uno de cuatro hámsteres inoculados vía oral con cinco metacestodos sin irradiar (testigos), y los cuatro restantes con cinco metacestodos irradiados en algunos casos con 0.2 kGy, y en otros con 0.3 kGy. Los 96 hámsteres fueron sacrificados humanitariamente después de 21 días pos inoculación, empleando CO₂ y se obtuvieron los intestinos. La mucosa de cada intestino se observó al microscopio estereoscópico, con el fin de localizar y recolectar los parásitos. Tanto para la prueba de evaginación *in vitro* como para la de inoculación vía oral *in vivo*, se utilizaron sólo los metacestodos que se encontraban en estado vesicular, que estaban completos, con la membrana materna y el líquido vesicular. Los resultados obtenidos se analizaron con la prueba de Ji cuadrada y la prueba de rango de Wilcoxon para muestras pareadas.

Resultados

En cada ensayo de evaginación se emplearon 40 metacestodos sin irradiar, que fueron los testigos y 40 metacestodos irradiados con 0.2 kGy y 40 irradiados con 0.3 kGy.

El número de metacestodos irradiados con 0.2 y 0.3 kGy y testigos que evaginaron, obtenidos a partir de doce cerdos se muestran en el Cuadro 1. La proporción de metacestodos evaginados en el grupo testigo (no irradiado) fue mayor (40.65%), en comparación

Cuadro 1

EVAGINACIÓN *in vitro* DE METACESTODOS IRRADIADOS Y TESTIGOS (SIN IRRADIAR)
In vitro EVAGINATION OF IRRADIATED AND NON-IRRADIATED (CONTROL) CESTODES

Pig number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	
Control	13	10	30	7	9	28	16	10	37	8	1	18	187/460*	40.65**
0.2 kGy								2	40	16	1	10	69/180	38.33
0.3 kgy	17	6	26	3	9	15	11						87/280	31.07**

In all the experiments the total number of metacestodes was 40, except in the case of pig number 12 where 20 metacestodes were used.

*Evaginated metacestode/total number of metacestodes.

** Differences were found between the control group and the group irradiated with 0.3 kGy ($P = 0.008$), Chi square test.

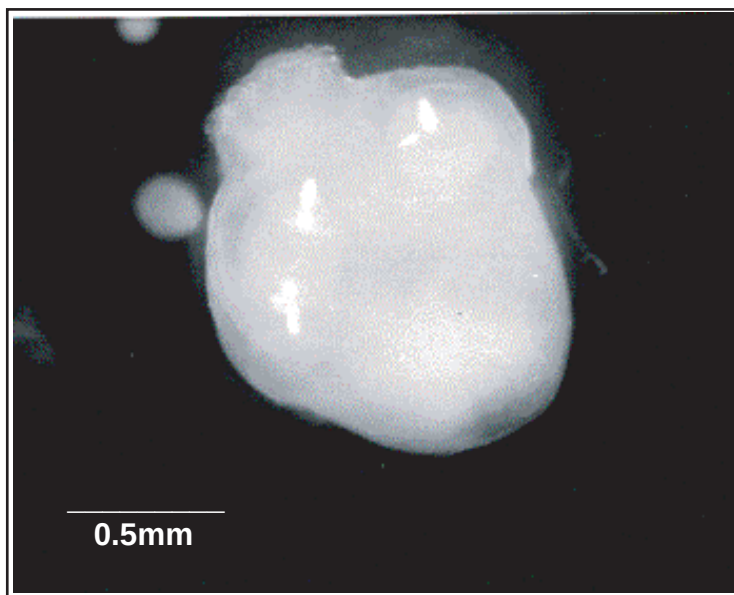


Figura 1: Escolex obtenido a los 21 días posinfección de un hámster inoculado con metacestodos de *Taenia solium* irradiado con 0.2 kGy.

Figure 1: Scolex obtained 21 days post-infection from a hamster inoculated with *Taenia solium* metacestodes irradiated with 0.2 kGy.

Cuadro 2

TENIAS Y ESCOLICES OBTENIDOS A PARTIR DE INTESTINOS DE HÁMSTER
A LOS 21 DÍAS POST INOCULACIÓN

TAENIAS AND SCOLICES OBTAINED FROM HAMSTER INTESTINES 21
DAYS AFTER INOCULATION

Pig	Number of <i>Taenias</i>	Number of scolices irradiated with 0.3 kGy	Number of scolices irradiated with 0.2 kGy.
1	1, 1, 3, 3	1, 1, 0, 3	
2	2, 2, 5, 4	1, 0, 2, 1	
3	0, 4, 0, 3	0, 0, 0, 0	
4	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0	
5	2, 3, 0, 0	2, 2, 0, 0	
6	3, 2, 2, 4	0, 1, 1, 0	
7	2, 1, 2, 0	0, 1, 0, 0	
8	2, 0, 2, 1		0, 1, 2, 1
9	5, 3, 1, 4		2, 1, 0, 0
10	4, 5, 4, 5		2, 1, 1, 0
11	0, 3, 1, 0		1, 1, 0, 0
12	3, 2, 3, 0		3, 2, 2, 4
Total	97/240	16/140	24/100
%	40.41*	12.90*	24

*Differences were found between the control group and the group irradiated with 0.3 (P = 0.01) Wilcoxon range test.

was inoculated with metacestodes radiated with 0.2 kGy. Animals that were inoculated with five non-radiated metacestodes had taenias with an approximate length of 21 cm and the maximum number of taenias that were obtained from one hamster was five. Significant differences were found between the control group and the group radiated with 0.3 kGy (P = 0.015).

Discussion

In this research project the doses of 0.2 kGy and 0.3 kGy were observed to be effective in inhibiting the development of the parasite from the metaces-

con los irradiados con 0.3 kGy (31.075%) (P = 0.008). Cuando se comparó el grupo testigo con los metacestodos irradiados con 0.2 kGy, no se encontraron diferencias (P = 0.59).

En los hámsteres que fueron inoculados con metacestodos irradiados con 0.3 kGy y 0.2 kGy, al inspeccionar sus intestinos sólo se encontraron escolices a los 21 días posinoculación (Figura 1). De los que se inocularon con metacestodos de *T. solium* sin irradiar, se recuperaron tenias (Cuadro 2 y Figura 2).

En el grupo de radiados, el número máximo de escolices recuperados fue de cuatro en un hámster que fue inoculado con metacestodos irradiados con 0.2 kGy. En los animales que fueron inoculados

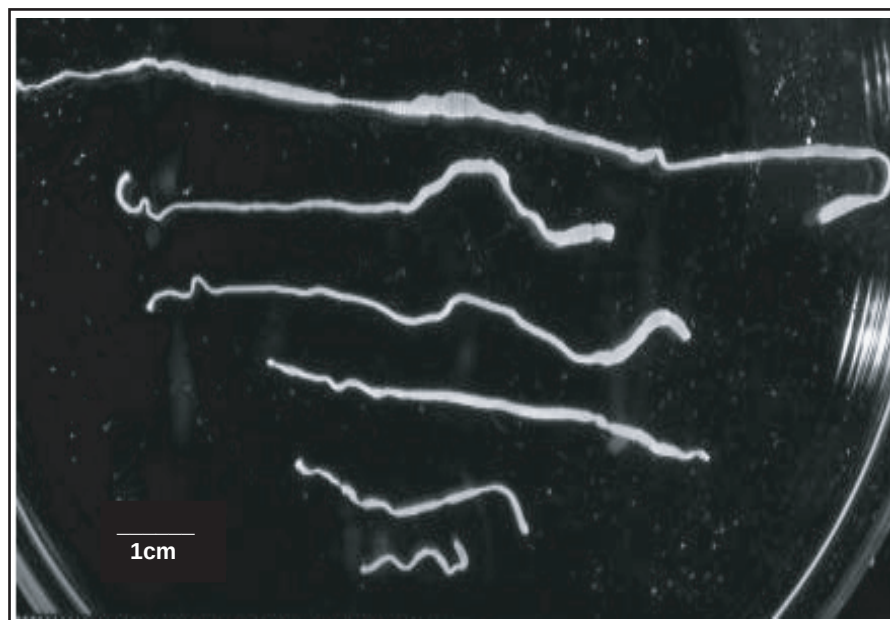


Figura 2: Tenias obtenidas del intestino de un hámster inoculado con metacestodos de *T. solium* sin irradiar.

Figure 2: Taenias obtained from the intestine of a hamster inoculated with non irradiated *T. solium* metacestodes.

tode phase to an adult *T. solium*. Similar results were obtained with 0.3 kGy dose when the hamsters were inoculated orally, in comparison with the 0.2 kGy dose. We must indicate that this similitude in results derives from the fact that with both irradiation doses you only obtain scolices. Nevertheless, the number of scolices that were obtained was higher when the irradiation dose was 0.2 kGy. It is concluded that a dose of 0.3 kGy has a larger safety margin.

It has been reported that a 0.3 kGy dose is capable of inducing DNA fragmentation and apoptosis in scolices obtained 21 days post infection.²³ Similar structures were obtained in hamsters that consumed metacestodes irradiated with 0.2 kGy; therefore, it is speculated that this dose could cause a similar biological effect on the parasite, with the additional advantage of a lower cost of this dose. Nevertheless, for the time being the 0.3 kGy dose is more reliable.

There are no differences between the metacestodes that evaginated after being irradiated with 0.2 kGy and the control group (non irradiated). When comparing the proportion of evaginated metacestodes irradiated with 0.3 kGy, it was lower than the control group; nevertheless, the capacity to evaginate was preserved *in vitro*. This suggests that perhaps the *in vitro* evagination test may not be an adequate criterion to evaluate viability of irradiated metacestodes.

It is important to take into consideration the fact that a 0.2 kGy gamma radiation dose has the capacity of controlling other pathogenic agents such as: *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogene* and *E. coli*. Likewise, other animal origin food such as pork and poultry may be irradiated with a 0.2 kGy dose, without suffering any organoleptic changes.^{19,20} A 7 kGy dose does not induce organoleptic changes in pork.^{22,24} It

con cinco metacestodos sin irradiar se recuperaron tenias con longitud máxima aproximada de 21 cm y el número máximo de tenias recuperadas a partir de un solo hámster fue de 5. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo testigo y el grupo irradiado con 0.3 kGy ($P = 0.015$).

Discusión

En el presente trabajo de investigación se observó que las dosis de 0.2 kGy y 0.3 kGy son efectivas para inhibir el desarrollo del parásito de la fase de metacestodo a *T. solium* adulta. Con la dosis de 0.3 kGy se obtuvieron resultados similares cuando se inoculó por vía oral a los hámsteres, en comparación con la dosis de 0.2 kGy. Cabe señalar que esta similitud en los resultados consiste en que con ambas dosis de radiación sólo se obtienen escolices. Sin embargo, el número de escolices obtenidos fue mayor cuando se irradió con la dosis de 0.2 kGy, se concluye que la dosis de 0.3 kGy presenta mayor margen de seguridad.

Se ha referido que una dosis de 0.3 kGy es capaz de inducir fragmentación de ADN y apoptosis en los escolices obtenidos 21 días después de la infección.²³ En los hámsteres que consumieron metacestodos irradiados con 0.2 kGy, se obtuvieron estructuras similares, por lo que se especula que esta dosis podría causar un efecto biológico similar en el parásito, con la ventaja adicional de que esta dosis es de costo menor. Sin embargo, por el momento la dosis de 0.3 kGy es la más confiable.

No existen diferencias entre los metacestodos que evaginaron después de ser irradiados con 0.2 kGy y el grupo testigo (no irradiados). Al comparar la proporción de metacestodos evaginados irradiados con

has also been reported that a dose of up to 30 kGy does not induce changes in nutritional quality of pork.

In Mexico, the use of radiation technology was approved by the government and its application is authorized for meat (chicken, pig, fish), fresh fruits and vegetables, dry milk and eggs. Therefore, this technology could be used in rural areas where these basic products are produced, in order to control pathogenic agents that could be in them and thus increase the product half life.²⁷

This study confirms that metacestodes irradiated with 0.2 and 0.3 kGy preserve their evaginating capacity, an observation that had been previously reported.²¹ Nevertheless, these irradiated metacestodes, even though they evaginate, lose the capacity to transform into an adult parasite, even though the scolices adhere to the intestinal wall.

The *in vitro* evagination results of this study, when compared to those obtained in metacestodes irradiated with 7 kGy, made evident the capacity of this dose to completely inhibit evagination and the development of the parasite in hamsters,²⁴ taking into account another previous study where the *in vitro* effect of irradiation on evagination was evaluated with 0.5 kGy and 0.7 kGy dose where it was reported that there were no differences between the evagination percentages that were obtained in the control group and the irradiated ones for the 0.7 dose. Nevertheless, when the 0.5 kGy dose was used, the evagination percentages were 74 for irradiated ones and 82 points for the control group.²² Differences obtained between *in vitro* evagination values may be attributed to certain factors such as the radiation that was used, handling of metacestodes in different experiments and degree of affectation that the immune response of the pig may cause.

A germinal tissue zone has been described in the region of the neck of *in vitro* evaginated metacestodes using the incorporation of thymidine and autoradiography technique. The cells of this group have large prominent nuclei, abundant ribosomes; the authors propose that this cell type proliferates, differentiates and migrates to the tegument,²⁸ for which they could be more susceptible to irradiation damage.

At this time, it is known that gamma radiation affects the biological systems through two tracks, the direct one that are the effects caused by the interaction between DNA and radiation,²⁹ and the indirect track that is a consequence of the interaction of DNA with free radicals that are formed during the irradiation process,^{29,30} both may harm DNA and the magnitude of the damage shall be related to the radiation dose that is used.

In conclusion, taking into account the results, it

0.3 kGy, ésta fue menor que la del grupo testigo; sin embargo, se conservó la capacidad de evaginar *in vitro*. Esto sugiere que quizá la prueba de evaginación *in vitro* no sea un criterio adecuado para evaluar la viabilidad de los metacestodos irradiados.

Es importante considerar que una dosis de radiación gamma de 0.2 kGy posee la capacidad de controlar otros agentes patógenos, como *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*. Asimismo, otros alimentos de origen animal, como la carne de cerdo y pavo, pueden ser irradiados con la dosis de 0.2 kGy, sin presentar cambios organolépticos.^{19,20} Una dosis de 7 kGy no induce cambios organolépticos en carne de cerdo.^{22,24} También se ha referido que una dosis de hasta 30 kGy no induce cambios en la calidad nutritiva de la carne de cerdo.

En México, el uso de la tecnología de irradiación fue aprobado por el gobierno y se autoriza su aplicación en carnes (pollo, cerdo y pescado), frutas frescas y vegetales, leche en polvo y huevo. Por ello, esta tecnología podría emplearse en áreas rurales donde se producen estos insumos, con el fin de controlar agentes patógenos en ellos e incrementar la vida media del producto.²⁷

En este estudio se confirma que los metacestodos irradiados con 0.2 y 0.3 kGy conservan su capacidad para evaginar, una observación que anteriormente había sido documentada.²¹ Sin embargo, estos metacestodos irradiados, aunque evaginan, pierden su capacidad de transformarse en el parásito adulto, a pesar de que los escolices se adhieran a la pared intestinal.

Los resultados de la evaginación *in vitro* de este estudio, al ser comparados con los obtenidos de metacestodos irradiados con 7 kGy, evidenciaron la capacidad que esta dosis posee para inhibir completamente la evaginación y el desarrollo del parásito en hamsters,²⁴ al tomar en cuenta otro estudio previo en el cual se valoró el efecto de la radiación en la evaginación *in vitro* con dosis de 0.5 kGy y 0.7 kGy se refiere que no existieron diferencias entre los porcentajes de evaginación obtenidos en el grupo testigo y los irradiados, para el caso de la dosis de 0.7; sin embargo, cuando se empleó la dosis de 0.5 kGy, los porcentajes de evaginación fueron de 74 para los irradiados y 82 puntos para el grupo testigo,²² las diferencias obtenidas entre los valores de evaginación *in vitro* pueden ser atribuidas a algunos factores como dosis de radiación empleada, manejo de los metacestodos en distintos experimentos y grado de afectación que la respuesta inmunológica del cerdo pudiera provocar.

En los metacestodos evaginados *in vitro* se ha descrito una zona de tejido germinal en la región del cuello, empleando la técnica de autorradiografía e incorporación de timidina. Este grupo de células tiene

is proposed that a 0.3 KGy dose is useful to avoid the development of the *T. solium* metacestode into an adult parasite. Also, it is recommended not to substitute the 0.3 dose by the 0.2 kGy dose, since the 0.3 kGy dose has a significant effect on the *T. solium* metacestode viability, as well as in the inoculation, and this represents a higher safety if the meat is going to be consumed. It is pertinent to use the radiation technology in combination with other methods, such as sanitary inspection and basic hygiene practices.

Acknowledgements

The authors wish to thank for the financial support of the International Atomic Energy Organism, National Science and Technology Council, number 35418-B and PAPIIT IN-206301, project PROMEP /103.5704/2862, the Nuclear Sciences Institute (especially Epifanio Cruz) for help with radiation and the Biomedical Research Institute for the donation of the hamsters used for this study. Thanks to Aureliano Torres Garcia and Maribel Nieto, and, finally, to the reviewers of this study, since their comments and suggestions contributed to the improvement of the same.

Referencias

1. World Health Organization. Food Irradiation, a technique for preserving and improving safety of food. Geneva Switzerland: WHO, 1988.
2. Sotelo JO, Del Brutto OH, Roman G. Cysticercosis. *Curr Clin Trop Infect Dis* 1996;16:240-259.
3. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. 7ª ed. Mexico (DF): Limusa, 2003.
4. Acevedo HA. Economic impact of porcine cysticercosis. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, editors. Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982: 63-68.
5. Aluja AS. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F, editors. Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press, 1982: 53-62.
6. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A *et al.* *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitic disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2000;15:1875-1890.
7. Yancey LS, Diaz-Marchan PJ, White AC. Cysticercosis: Recent advances in diagnosis and management of neurocysticercosis. *Curr Infect Dis Rep* 2005; 1: 39-47.
8. Hernandez M, Beltran C, Garcia E, Fragoso G, Gevor-

un núcleo grande y prominente, abundantes ribosomas; los autores proponen que este tipo celular prolifera, se diferencia y migra al tegumento,²⁸ por lo que podrían ser más susceptibles al daño por irradiación.

Actualmente se sabe que la radiación gamma afecta a los sistemas biológicos por dos vías, la directa que son los efectos resultantes de la interacción entre el ADN y la radiación,²⁹ y la indirecta que es consecuencia de la interacción del ADN con los radicales libres, formados durante el proceso de irradiación,^{29,30} ambos pueden causar daño al ADN, y la magnitud de éste estará en función de la dosis de radiación empleada.

En conclusión y tomando en cuenta los resultados, se propone que una dosis de 0.3 KGy es útil para evitar el desarrollo del metacestodo de *T. solium* a parásito adulto. Asimismo, se recomienda no sustituir la dosis de 0.3 por la de 0.2 kGy, ya que la dosis de 0.3 kGy posee un efecto significativo en la viabilidad del metacestodo de *T. solium* tanto en la evaginación *in vitro* como en la inoculación, lo que representa mayor seguridad si la carne se destina a consumo. Es pertinente usar la tecnología de radiación en combinación con otros métodos, como la inspección sanitaria y las prácticas básicas de higiene.

Agradecimientos

Se agradece el financiamiento otorgado por el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, número 35418-ByPAPIITIN-206301, proyecto PROMEP / 103.5704/2862, al Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM (en especial a Epifanio Cruz) por las facilidades en la radiación y al Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM por la donación de los hámsteres que se emplearon en este trabajo. Se agradece a Aureliano Torres García y Maribel Nieto. Finalmente, a los revisores del presente estudio, pues sus comentarios y sugerencias contribuyeron a mejorarlo.

-
- kian G, Fleury A *et al.* Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett* 2001; 1: 13-17.
 9. Gonzales AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Plincher JB, Chavera A *et al.* Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1990; 2:194-199.
 10. Secretaría de Salud-1994 Norma para la Prevención y Control del Complejo Teniosis Cisticercosis, México (DF):SS, DOF, 1994.
 11. Fan PC, Ma YX, Kuo CH, Chuang WC. Survival of *taenia solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4°C. *J Parasitol* 1998;1: 174-175
 12. Sciutto E, Hernandez M, Garcia G, Aluja de AS, Villalobos AN, Rodarte LF, *et al.* Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of

- circulating antibody and viable parasites. *Vet Parasitol* 1988; 3; 185-194.
13. Sciutto E, Martinez JJ, Villalobos NM, Hernandez M, Jose MV, Beltran C *et al*. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol* 1998;2;299-313.
 14. Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, *et al*. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 4; 502-512.
 15. Huerta M, de Aluja A, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M *et al*. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001; 20; 262-266.
 16. de Aluja AS, Villalobos N, Nava G, Toledo A, Martinez JJ, Plancarte A *et al*. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*. 2005;23; 4062-4069.
 17. Flisser A, Gauci CG, Zoil A, Martinez-Ocana J, Garza Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL *et al*. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 2004; 72:5292-7
 18. Fragoso G, Mellor A, Lamoyi E, Hernandez M, Lomeli C, Govezensky G *et al*. Increase of innate resistance to *T. crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Parasitology* 1996;112; 119-124.
 19. Urbain WM. Food Irradiation. Orlando: Academic press,1986.
 20. Farkas J. Irradiation as a method for decontaminating food. *Int J Food Microbiol* 1988;44:189-204.
 21. Verster A, Du Pless TA, Van der Heever IW. The effect of gamma irradiation on the cysticerci of *Taenia solium*. *Onderstepoort J Vet Res*1976; 1; 23-26.
 22. Aluja AS, Núñez JF, Villalobos AN. Efecto de la Irradiación gamma Co-60 sobre el metacestodo de *Taenia solium*. *Vet Méx* 1993; 24; 297-301.
 23. Flores-Perez I, Fragoso G, Sciutto E, Aluja A S. Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res* 2003;90;203-208.
 24. Nuñez J F. Efecto letal de la radiación gamma sobre el metacestodo de la *Taenia solium* en carne de cerdo (tesis de Maestría). México, (DF). UNAM, 1991.
 25. Verster A. The golden Hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort J Vet Res* 1974; 41; 23-28.
 26. Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol* 1998; 84; 882-886.
 27. Secretaría de Salud SA-1993 Bienes y servicios, irradiación de alimentos, dosis permitidas en alimentos, materias primas y aditivos Alimentarios. México (DF): SS, DOF,1994.
 28. Merchant M, Corella C, Willms K. Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes. *J Parasitol* 1997;3; 363-367.
 29. Simon HV, Haj-Yehia A, Levi S. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5; 415-418.
 30. Friedberg EC, Walker CG, Side W. DNA Repair and Mutagenesis,. Washington: ASM press, 1995.