

INACTIVACIÓN DE LOS PARÁSITOS ZONÓTICOS ALIMENTARIOS *ANISAKIS* Y *T. GONDII* EN PESCADO Y CARNE BASADA EN PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE

Abad, V.¹, Cebrián, G.¹, Álvarez, I.¹

e-mail: vabad@unizar.es; ialvalan@unizar.es; guiceb@unizar.es

¹ Universidad de Zaragoza/ Facultad de Veterinaria/ Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/ Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2).



INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Las enfermedades zoonóticas transmitidas por alimentos, como la anisakiasis y la toxoplasmosis suponen un grave problema sanitario y económico debido a la alta presencia de parásitos en pescado y carne. Actualmente, las estrategias utilizadas para su inactivación son los tratamientos térmicos o la congelación, los cuales comprometen la calidad del producto [1,2]. Hasta la fecha la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF, del inglés, *Pulsed Electric Fields*), que se caracteriza por producir la muerte de células vegetativas de microorganismos gracias al fenómeno de la electroporación aplicando campos eléctricos de alta intensidad (> 0,1 kV/cm) a un producto colocado entre dos electrodos, sumergido en una solución acuosa, de forma intermitente aplicando pulsos de corta duración (del orden de mili a microsegundos) [3], nunca ha sido testada para la destrucción de ninguna de las formas de *T. gondii* y apenas hay estudios en la inactivación de *Anisakis* spp.

OBJETIVO: Inactivar los parásitos zoonóticos alimentarios *Anisakis* spp. y *T. gondii* en pescado y carne con Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.

MATERIAL Y MÉTODOS

Anisakis spp.

Inactivación *Anisakis* con PEF

Escala Laboratorio

Escala Planta Piloto

Escala industrial



Equipo PEF laboratorio (EPULSUS-PM-10, 2 kW, Energy Pulse System, Lisboa, Portugal)



Equipo PEF planta piloto (PEFPilot™ Dual system, ELEA (Quakenbrück, Alemania)



Equipo PEF industrial (Treatment bath TBD-320, ELEA (Quakenbrück, Alemania)

Anisakis en solución salina

Merluza (trozos 3 cm)

Merluza (filetes y ventrescas) Gallo

Merluza (filetes y ventrescas) Gallo

Evaluación de Calidad: Merluza y Gallo

Análisis microbiológicos: Aerobios y anaerobios psicrófilos, *Pseudomonas Shewanella*, Bacterias ácido-lácticas, Enterobacterias

Pérdidas por goteo
Pérdidas por cocinado
Capacidad de retención de agua

Simulación numérica: Comsol multiphysics

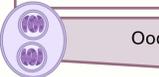
Toxoplasma gondii

Inactivación *T. gondii* con PEF

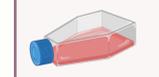
Ooquistes

Taquizoitos

Bradizoitos



Experimentación animal
Ratones
Detección parásito: qPCR; Tiempo: 2 meses



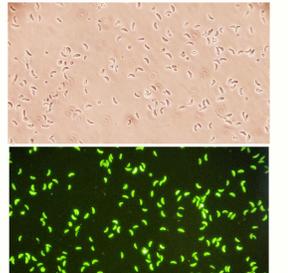
Experimentos en cultivo celular
Fibroblastos
Detección parásito: lector de placas (taquizoitos marcados con GFP); Tiempo: 7 días



Equipo PEF (Equipo PEF, Vitave, Praga, República Checa)



Cámara de tratamiento Electrodo paralelos GAP 2 cm



Taquizoitos *T.gondii* en cultivo celular (fibroblastos) Microscopio x40 (superior) Microscopio x40, Excitación 450-490 nm, Emisión: 505 nm (inferior)

Elaborado con BioRender.com

RESULTADOS

Anisakis spp.

La Figura 1 muestra la **inactivación** de *Anisakis* en ventrescas parasitadas tras ser sometidos a tratamientos PEF de distinto campo eléctrico y energía. Se puede observar que, al aumentar la intensidad de los tratamientos, disminuye la supervivencia de *Anisakis* spp. También se estudió el efecto de la **conductividad eléctrica** de la solución salina en la inactivación de este parásito. La Figura 2 muestra como al aumentar la conductividad eléctrica del medio de tratamiento disminuye la supervivencia hasta alcanzar una inactivación casi completa. Gracias a las **simulaciones numéricas** realizadas se puede observar en la Figura 3 que este aumento de inactivación es debido a la concentración del campo eléctrico en el *Anisakis* más que en el pescado. Esta circunstancia también justifica los resultados en la calidad: se inactiva *Anisakis* sin afectar a la calidad del pescado.

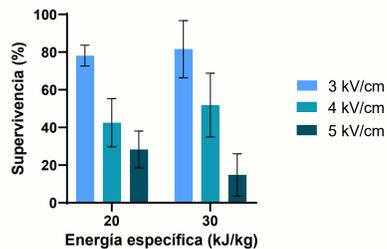


Figura 1. Influencia en el porcentaje de supervivientes de *Anisakis* spp. tras la aplicación de tratamientos PEF de 20 μ s y diferentes energías específicas e intensidades de campo. Las barras de error representan la desviación estándar.

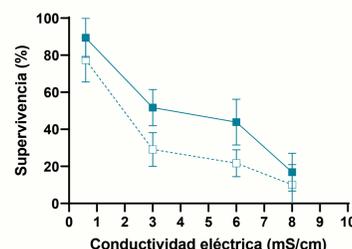


Figura 2. Influencia de la conductividad eléctrica en el porcentaje de supervivientes de *Anisakis* spp. tras la aplicación de tratamientos PEF de 7 μ s, 3 kV/cm y 20 kJ/kg (línea continua) y 40 kJ/kg (línea discontinua). Las barras de error representan la desviación estándar.

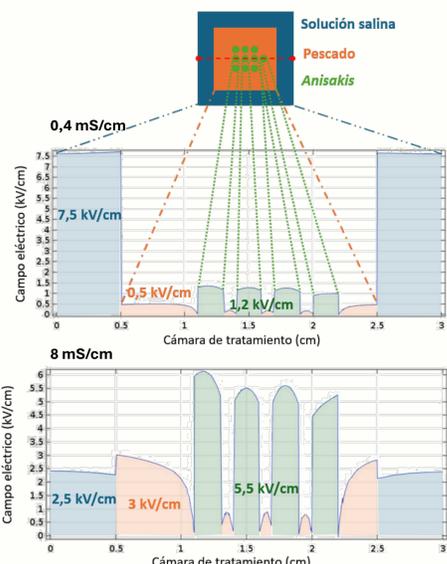


Figura 3. Representación del campo eléctrico obtenido por simulación numérica a lo largo de una cámara de 3 cm con dos medios de distinta conductividad: 0,4 mS/cm (superior) y 8 mS/cm (inferior).

En la Figura 4, se muestra un filete de merluza control y otro sometido a un tratamiento PEF, ambos tras 7 días de vida útil, no observándose diferencias visuales entre las muestras. Del mismo modo, no se observaron tampoco diferencias en los **análisis microbiológicos** realizados entre muestras control y PEF. La evolución del resto de **parámetros de calidad** para las muestras control y PEF fueron similares, mientras que las congeladas, y posteriormente descongeladas, presentaron mayores pérdidas por goteo, menor capacidad de retención de agua y mayores pérdidas por cocción.

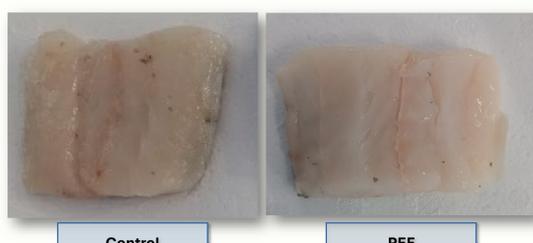


Figura 4. Filete de merluza control (izquierda) y PEF (3 kV/cm; 20 kJ/kg, 7 μ s) (derecha) tras 7 días de vida útil

Toxoplasma gondii

Los **ooquistes** de *T. gondii* son la forma del parásito que se elimina en las heces de los hospedadores definitivos, los felinos. En la Figura 5, se puede observar el porcentaje de **ratones** infectados (determinados mediante qPCR de cerebro) para las distintas dosis de inoculación de ooquistes control y PEF. A excepción de la dosis de 250 ooquistes, se observa una disminución en la capacidad infectiva de los ooquistes tratados por PEF. Por otra parte, como se observa en la Figura 6, los resultados obtenidos en **cultivos celulares** coinciden con los obtenidos en ratón y también sugieren que el porcentaje de inactivación de los ooquistes tras el tratamiento de PEF se encontraría en torno al 50 % para dosis por debajo de 40 ooquistes.

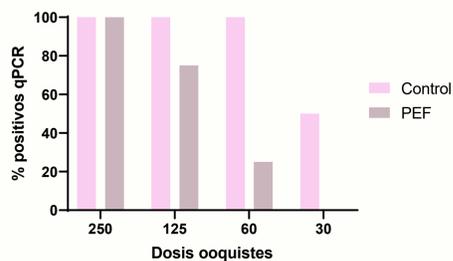


Figura 5. Influencia de la dosis de ooquistes de *T. gondii* en el porcentaje de ratones infectados (determinada mediante qPCR de muestras de cerebro). Muestras control (no tratadas) y tratadas por PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 μ s).

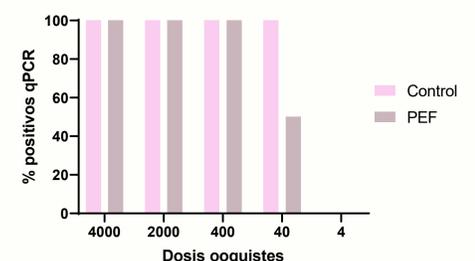


Figura 6. Influencia de la dosis de ooquistes de *T. gondii* en el porcentaje de pocillos con fibroblastos infectados (determinado por qPCR tras 7 días de cultivo). Muestras control (no tratadas) y tratadas por PEF (15 kV/cm; 50 kJ/kg; 3 μ s).

Carne de ratón infectada con *T. gondii* que contiene **bradizoitos** ha sido sometida a tratamientos PEF obteniendo unos resultados similares a los mostrados en la Figura 5, determinándose que tratamientos de 3,3 kV/cm y 26 kJ/kg reducen la viabilidad de los bradizoitos en un 50%.

Los esporozoítos contenidos en los ooquistes esporulados de *T. gondii* una vez dentro del hospedador son liberados y se transforman en **taquizoitos**. Obtener este estadio de *T. gondii* en la naturaleza es complicado, por ello, se multiplica en **cultivo celular**. En la Figura 7, se muestran los valores de fluorescencia de taquizoitos (marcados con GFP, *Green Fluorescent Protein*) en pocillos con diferentes concentraciones del parásito, sometidos a distintos tratamientos PEF, tras 7 días de incubación en una placa de 24 pocillos tapizada con fibroblastos. Como se ve, para no detectar crecimiento a concentraciones altas (10^4 - 10^5 taquizoitos/ml) es necesario aplicar tratamientos de 5-6 kV/cm.

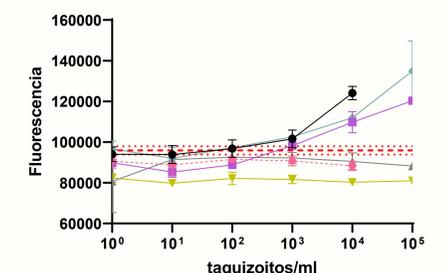


Figura 7. Valores de fluorescencia de diferentes concentraciones de inoculación de taquizoitos en placas de 24 pocillos tapizadas con fibroblastos: Control (●), PEF (50 pulsos, 10 μ s): 3 kV/cm (■), 4 kV/cm (◆), 5 kV/cm (▲), 6 kV/cm (▼), tratamiento térmico (●) (100 °C, 15 minutos) y blanco (-) tras 7 días incubados a 37 °C con 5% CO₂. Las barras de error representan la desviación estándar.

CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que la tecnología de los **PEF** podría ser una **alternativa** a tecnologías tradicionales como la congelación o tratamiento térmico para la **inactivación** de ambos **parásitos**, aunque todavía se requieren numerosos estudios para confirmar los resultados, especialmente en *T.gondii*. Los **cultivos celulares** están siendo una buena **alternativa** para el estudio de la letalidad de PEF en *T.gondii* y reducir número de **animales** de **experimentación**.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Cátedra AgroBank-UdL "Calidad e Innovación en el Sector Agroalimentario" así como a la Cátedra SAMCA de Desarrollo Tecnológico de Aragón y al Gobierno de Aragón (ZeroParasitos A16_24, A03_23R y contrato de Abad. V.) la concesión de una ayuda económica para la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ELIKA. *Anisakis*. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eu/fichas-de-peligros/toxoplasma-gondii/>. Acceso: 17/03/2025
- [2] ELIKA. *Toxoplasma gondii*. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eu/fichas-de-peligros/toxoplasma-gondii/>. Acceso: 17/03/2025
- [3] Raso, J., Heinz, V., Álvarez, I. y Toepfl, S. "Pulsed electric fields technology for the food industry" (Springer, 2022).



Grupo de Investigación en Nuevas Tecnologías de Procesado de los Alimentos (NEOTEC) Universidad Zaragoza



Instituto Universitario de Investigación Mixto Agroalimentario de Aragón



Universidad Zaragoza