

ESCUELA DE DOCTORADO Y ESTUDIOS DE POSTGRADO
MÁSTER UNIVERSITARIO EN SEGURIDAD Y CALIDAD DE
LOS ALIMENTOS
TRABAJO FIN DE MÁSTER
CURSO ACADÉMICO [2020-2021]

TÍTULO:

Riesgo de infección por *Escherichia coli* O157:H7 por consumo de ensaladas de cuarta gama

AUTOR:

Víctor Antolín Quintana

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i> : importancia de <i>E. coli</i> O157:H7	8
4.1.1. <i>Brotos de E. coli</i> O157:H7 asociados al consumo de ensaladas de cuarta gama	9
4.2. Vías de contaminación de las ensaladas de cuarta gama	11
4.2.1. <i>Contaminación durante el cultivo</i>	11
4.2.2. <i>Contaminación durante la cosecha</i>	12
4.2.3. <i>Contaminación en la industria</i>	13
4.2.4. <i>Contaminación a nivel consumidor</i>	14
4.3. Medidas de prevención y control	14
4.4. Recomendaciones	16
5. CONCLUSIONES	17
6. BIBLIOGRAFÍA	17

RESUMEN

El consumo de Productos Frescos Mínimamente Procesados (PFMP) o de cuarta gama ha aumentado en los últimos años debido a los cambios de comportamiento y costumbres de la sociedad, destacando especialmente el consumo de ensaladas por las ventajas que ofrecen en términos de comodidad y ahorro de tiempo. Sin embargo, estos productos, antes de ser envasados y preparados para su comercialización son sometidos a procesos de higienización que pueden no ser lo suficientemente eficaces para eliminar los patógenos que los vegetales hayan adquirido durante la cadena de producción, pudiendo ocasionar brotes de toxiinfecciones alimentarias. En este contexto, el serotipo de *Escherichia coli* O157:H7 es considerado un patógeno emergente, especialmente virulento y peligroso por su capacidad para producir una toxina denominada toxina *Shiga*, la cual, además de colitis hemorrágica, puede ocasionar Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), un trastorno que se caracteriza por insuficiencia renal y que puede derivar en un tratamiento de diálisis de por vida e incluso la muerte. Es por esto que hay que tener especial cuidado en todas las fases por las que pasan las ensaladas de cuarta gama, desde el campo de cultivo hasta que llegan a nuestros hogares, siguiendo las recomendaciones y la normativa vigente para tratar de evitar su contaminación y los posibles problemas de salud pública que se pudieran ocasionar.

Palabras clave: PFMP, *Escherichia coli* O157:H7, ensalada, toxina *Shiga*, SUH.

ABSTRACT

The consumption of Minimally Processed Fresh Products (MPFP) or fourth range products has increased in recent years due to changes in the behavior and customs of society, being especially remarkable the salad's intake because of the advantages offered by these products, both in terms of comfort and time saving. However, these products, before being packaged and prepared for market launching, are subjected to sanitation processes that may not be effective enough to eliminate the pathogens the vegetables have acquired during the production chain, which may cause foodborne disease outbreaks. In this context, the *Escherichia coli* O157: H7 serotype is considered a dangerous pathogen with high virulence, due to its ability to produce a toxin called *Shiga* toxin, which, in addition to hemorrhagic colitis, can cause Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), a disorder characterized by kidney failure that can lead to lifelong dialysis treatment and even death. This is why special care must be taken in all the phases through which fourth-range salads go through from the cultivation fields to their arrival at our homes, following the recommendations and current regulations to try to avoid its contamination and any possible public health problems that may be caused.

Key Words: MPFP, *Escherichia coli* O157:H7, salad, *Shiga* toxin, HUS.

1. INTRODUCCIÓN

Los vegetales son alimentos esenciales en una dieta equilibrada y saludable puesto que son una fuente de carbohidratos, antioxidantes, minerales, vitaminas y fibra, y su consumo de forma regular contribuye a prevenir enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y algunos tipos de cáncer. Por ello, los nutricionistas enfatizan en la importancia de consumir verduras a diario, mejor si pueden ser frescas y crudas, ya que, de esta manera, mantienen todas sus propiedades nutricionales ^[1, 2]. Como resultado del interés de la población por llevar un estilo de vida saludable y de cambios en los hábitos de consumo, los Productos Frescos Mínimamente Procesados (PFMP) o de cuarta gama, especialmente las ensaladas, han experimentado un gran crecimiento en el sector alimentario durante los últimos años ^[3].

Los alimentos de cuarta gama son hortalizas y frutas frescas en cuyo procesado solo se realizan operaciones de lavado/desinfección, pelado, cortado y envasado en atmósfera protectora (Figura 1). Por tanto, no son sometidos a ningún tipo de tratamiento térmico más allá de que su transporte y comercialización se realiza bajo cadena de frío, lo que asegura la frescura del producto ^[4]. Este mínimo procesamiento garantiza que se mantengan las características organolépticas y nutricionales del alimento, ofreciendo, además, un producto listo para consumir, lo que le otorga un valor añadido ^[5].



Figura 1: fases en la producción y comercialización de ensaladas de cuarta gama: cultivo, troceado e higienización, envasado, almacenamiento, distribución y venta ^[6 modificado].

Sin embargo, estos alimentos están asociados con un riesgo para los consumidores ^[7], ya que pueden actuar como medios efectivos para la transmisión de patógenos ^[8]. Estos productos pueden contaminarse con microorganismos patógenos mientras están en el campo ^[9], durante la cosecha ^[10], el transporte, procesamiento, distribución o la venta ^[11], e incluso en el propio hogar ^[12]. Por ello, en las últimas décadas se ha observado un aumento en las Toxiinfecciones Alimentarias (TIA) asociadas a patógenos que pueden colonizar la superficie y los tejidos internos de los vegetales, contaminarlos y causar brotes o infecciones crónicas, lo que supone un claro riesgo de salud pública ^[13]. En este contexto, las cepas patógenas de la bacteria *Escherichia coli* pueden ser responsables de enfermedades de origen alimentario vehiculizadas por vegetales frescos. Se trata de patógenos que siguen una vía de transmisión fecal-oral, como resultado de falta de higiene o de control en algún proceso. Algunas de estas cepas, en concreto, el serotipo *E. coli* O157:H7, son especialmente preocupantes dada su virulencia, siendo responsables de infecciones que pueden derivar en graves complicaciones para la salud de los consumidores ^[14].

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión bibliográfica sobre el riesgo de infección por *E. coli* O157:H7 asociado al consumo de ensaladas de cuarta gama, en el que se abordarán los siguientes aspectos:

- Describir el patógeno, sus mecanismos de patogenicidad y posibles complicaciones.
- Identificar las principales fuentes de contaminación.
- Analizar las medidas de control a adoptar para prevenir la contaminación del producto.
- Reseñar las recomendaciones a seguir para garantizar la seguridad alimentaria de las ensaladas de cuarta gama.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica de documentos científicos sobre el tema objeto del estudio. En una primera aproximación, se realizó una búsqueda de amplio rango en *Google Scholar* para conseguir información general acerca del tema. A continuación, se realizaron búsquedas en las bases de datos de *Medline* con el buscador *PubMed*, de las editoriales *Elsevier* y *John Wiley & Sons* con los buscadores *ScienceDirect* y *Wiley Online Library*, así como en la biblioteca digital *SciELO*.

En la búsqueda, como norma general, se acotó un período de tiempo del 2010 al 2021, y las palabras clave, utilizadas en diferentes combinaciones, fueron: “ready to eat vegetables”, “foodborne outbreak”, “fresh cut foods”, “*E. coli*”, “O157:H7”, “salad”, “HUS”, “shiga”, “innovative techniques”. Se consultaron también páginas web de agencias como la *European Food Safety Authority* (EFSA), *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), *Eurosurveillance*, la *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición* (AESAN), la *Organización Mundial de la Salud* (WHO) y documentos oficiales de la *Comisión Europea* (CE) y el *Boletín Oficial del Estado* (BOE). Toda la información que se ha recabado se ha seleccionado y clasificado en función del año de publicación, dando preferencia a lo más actual y a la relevancia de su contenido en relación con el tema a tratar. En la figura 2 se muestra el cronograma de las tareas realizadas.



Figura 2: cronograma de las tareas realizadas en el presente Trabajo de Fin de Máster (Diagrama de Gantt). Se tuvo en cuenta una temporalidad de 5 días a la semana, durante 4 semanas cada mes, durante 5 meses incluyendo las correcciones y la defensa del trabajo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cepas patógenas de *Escherichia coli*: importancia de *E. coli* O157:H7

La bacteria *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia de las enterobacterias que se encuentra de forma natural en el intestino de los animales de sangre caliente ^[15]. La mayoría de las cepas de esta especie son inocuas, sin embargo, hay algunas cepas patógenas que generalmente se asocian a diarreas y las cuales se clasifican en 6 patotipos (Tabla 1). Entre ellos destaca el grupo de *E. coli* enterohemorrágicas, también denominadas verotoxigénicas o productoras de toxina *Shiga* (EHEC/VTEC/STEC). Dentro de este grupo, *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente asociado a diarrea hemorrágica y al Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) ^[16]. Por lo tanto, se trata de un patógeno muy virulento, con una dosis infectiva muy baja (10-100 células) ^[17], que se ha asociado a grandes brotes de TIA ^[18].

Tabla 1: clasificación de las cepas patógenas de *E. coli* en patotipos, síntomas, serotipos y factores de virulencia ^[19].

Patotipos	Síntomas	Principales serotipos	Factores de virulencia
<i>E. coli</i> enteropatógenas (EPEC)	Diarrea acuosa, dolor abdominal, vómito, fiebre baja.	O55, O86, O142, O11:H-, O127	Pili con forma rizada y plásmido de factor de adherencia de EPEC.
<i>E. coli</i> enterotoxigénicas (ETEC)	Diarrea aguda acuosa.	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-, O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20	Toxina termolábil y toxina termoestable.
<i>E. coli</i> enteroinvasivas (EIEC)	Diarrea con moco y sangre o acuosa, cuadro disentérico.	O28:H, O112ac:H-, O144:H, O152:H-, O164:H-, O167:H-	Invasividad y plásmido EIEC.
<i>E. coli</i> enterohemorrágicas, verotoxigénicas o productoras de toxina <i>shiga</i> (EHEC/VTEC/STEC)	Síndrome urémico hemolítico, diarrea hemorrágica, dolor abdominal, fiebre, vómito.	O157:H7 , O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145	Toxina <i>Shiga</i> (Stx-1 y 2), intimina y plásmido O157.
<i>E. coli</i> enteroagregativas (EAEC).	Diarrea acuosa con moco sin sangre.	O44:H18	Citotoxinas, proteínas de membrana externa, fimbrias, toxina termoestable, proteínas Pet y Pic y plásmido EAEC.
<i>E. coli</i> con adherencia difusa (DAEC).	Diarrea acuosa sin sangre.	O126:H27	Fimbrias y proteínas de membrana externa.

La toxina *Shiga* (Stx), llamada así por el grado de similitud con la toxina producida por *Shigella dysenteriae*, es el principal factor de virulencia de STEC, causando colitis hemorrágica y SUH. Se han descrito dos tipos de Stx: Stx-1 y Stx-2, donde Stx-1 difiere de la toxina de *Shigella* en un solo aminoácido y Stx-2 coincide en un 56% con Stx-1, siendo la más tóxica y la que se asocia con más frecuencia al SUH ^[20]. Los genes de esta toxina están organizados en el operón de un fago que en estado lisogénico está silenciado, pero cuando comienza el ciclo lítico, se activa, induciendo así la síntesis de la toxina ^[21].

El SUH es una afección de los riñones en la cual estos pierden parcial o totalmente su funcionalidad de filtración vascular debido a que sus vasos sanguíneos se dañan o inflaman por formación de coágulos. Esta afección comienza cuando la Stx daña el endotelio después de que la bacteria haya infectado el intestino del huésped, activando el factor tisular e induciendo trombosis. El resultado es una insuficiencia renal que puede ser mortal o conllevar una diálisis de por vida para la persona afectada ^[22].

4.1.1. Brotes de E. coli O157:H7 asociados al consumo de ensaladas de cuarta gama

Debido al aumento del consumo de las ensaladas de cuarta gama, los brotes de TIA vinculados a este tipo de productos son cada vez más frecuentes ^[23]. En la tabla 2 se recogen los brotes de *E. coli* O157:H7 asociados a ensaladas de cuarta gama que han sido notificados en América del Norte y Europa en los últimos 15 años. EEUU y Reino Unido son los países en los que más casos se han producido, debido fundamentalmente a que la variedad de res y el tipo de explotación en los países anglosajones, sobre todo en EEUU, hacen que el ganado (su tracto gastrointestinal) sea más propenso a ser colonizado por *E. coli* O157:H7, de forma que, aunque los animales adultos suelen ser asintomáticos, pueden actuar como reservorio del patógeno ^[24]. Por otra parte, el producto implicado en la mayoría de los brotes es la lechuga romana, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía. De hecho, los vegetales de hoja verde como la lechuga, espinacas, albahaca, berros y brotes de alfalfa son los que se asocian con mayor frecuencia a brotes de TIA, siendo más escasos los producidos por otras hortalizas ^[6].

Tabla 2: brotes de *E. coli* O157:H7 asociados al consumo de ensaladas de cuarta gama notificados en América del Norte y Europa clasificados por: país, año, producto implicado, n° de casos, hospitalizaciones, SUH y muertes.

País	Año	Producto	Casos	Hospitalizaciones	SUH	Muertes	Referencia
Canadá	2019	Lechuga romana	4	1	0	0	[25]
EEUU (26 estados)	2006	Espinacas	199	102	31	3	[26]
EEUU (9 estados)	2011	Lechuga romana	58	33	3	0	[27]
EEUU (5 estados)	2012	Espinacas	33	13	2	0	[28]
EEUU (7 estados)	2015	Cebolla y apio	19	5	2	0	[29]
EEUU (2 estados)	2016	Brotos de alfalfa	11	2	0	0	[30]
EEUU (15 estados)	2017	Lechuga romana	25	9	2	1	[31]
EEUU (36 estados)	2018	Lechuga romana	210	96	27	5	[32]
EEUU (5 estados)	2019	Kit de ensaladas	10	4	1	0	[33]
EEUU (27 estados)	2019	Lechuga romana	167	85	15	0	[34]
EEUU (20 estados)	2020	Espinacas y lechuga romana	40	20	4	0	[35]
Islandia y Países Bajos	2007	Lechuga romana	50	20	0	0	[36]
Reino Unido	2013	Berros	161	10	1	0	[37]
Reino Unido	2016	Repollo	20	10	1	2	[37]
Reino Unido	2017	Escarola	47	16	1	0	[37]

4.2. Vías de contaminación de las ensaladas de cuarta gama

A pesar de que la contaminación por *E. coli* O157:H7 de las ensaladas de cuarta gama ocurre con menos frecuencia que en productos de origen animal (carne picada poco cocinada, leche cruda, quesos elaborados con leche sin pasteurizar...), el riesgo que supone la presencia del patógeno en ensaladas es considerable, principalmente porque se trata de alimentos que se consumen en crudo ^[5]. Por ello, es importante identificar las vías de contaminación y los factores que la favorecen, con el fin de adoptar medidas de prevención adecuadas ^[12].

4.2.1. Contaminación durante el cultivo

El agua de riego puede contaminarse con *E. coli* O157:H7 al entrar en contacto con heces de animales silvestres, efluentes de granjas o aguas residuales; también por la utilización de estiércol sin tratar que se filtra en el terreno y llega hasta las aguas subterráneas, o mediante lluvias o inundaciones que arrastran al patógeno hasta los depósitos o balsas de riego ^[38]. Por tanto, la calidad microbiológica del agua de riego es un factor clave para prevenir la contaminación de los vegetales en el campo. En este sentido, cabe señalar que, en el caso de que se utilice agua de riego depurada, la normativa vigente establece unos criterios de calidad que el agua regenerada debe cumplir para su uso agrícola ^[39]. Por otra parte, el tipo y la frecuencia de riego son factores importantes a la hora de la contaminación ^[40]. Diversos estudios han demostrado que el riesgo de contaminación es mayor en el riego por aspersión que en el riego por goteo o mediante surco. Esto se debe a que, al rociar la superficie del vegetal con agua, esta protege a los patógenos de condiciones ambientales adversas como la radiación ultravioleta, lo que les permite permanecer viables durante más tiempo y penetrar en la planta a través de los estomas o de heridas, invadiendo los tejidos internos del vegetal en los que quedan protegidos ^[41].

El uso de estiércol como fertilizante parece ser otra vía importante de contaminación, ya que el ganado, especialmente el vacuno, es el principal reservorio del patógeno. *E. coli* O157:H7 permanece viable en el estiércol fresco o mal compostado, manteniéndose en el suelo después de su aplicación. A partir del suelo contaminado, el patógeno puede introducirse en la planta a través de la raíz o contaminar las hojas con las salpicaduras del agua de riego o de lluvia ^[42]. Hay que tener en cuenta también la contaminación debida al contacto directo con animales portadores de la bacteria, ya sean silvestres o

domésticos, los cuales pueden acceder a campos de cultivo y contaminar el suelo con sus deposiciones ^[43].

Por otra parte, la época del año en la que se realiza el cultivo influye en la contaminación (Figura 3). La lluvia y los ciclos de crecimiento cortos favorecen la contaminación, mientras que el riesgo disminuye a medida que aumenta la radiación ultravioleta. La mayor probabilidad de contaminación tiene lugar en otoño (más lluvia y menos horas de sol), mientras que en primavera el riesgo de contaminación es menor que en verano, ya que, a pesar de que la radiación solar es menos intensa, el ciclo de crecimiento de los cultivos es más largo ^[44].

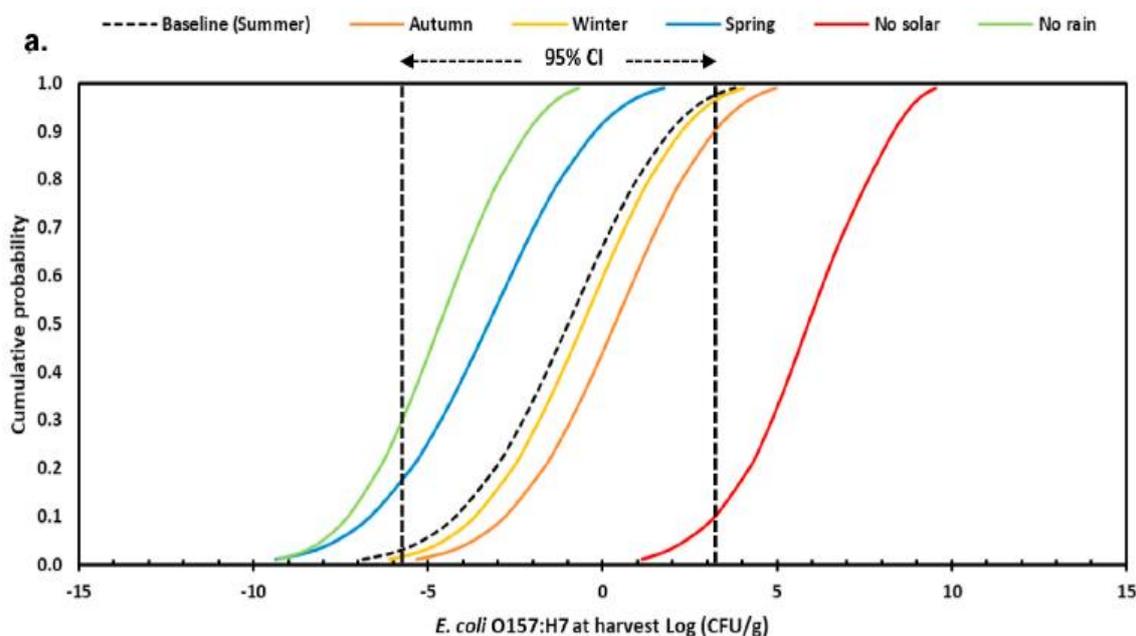


Figura 3: efecto de la estación de cultivo y factores meteorológicos (radiación ultravioleta y precipitación) sobre los niveles de *E. coli* O157:H7 en el momento de la cosecha ^[44].

4.2.2. Contaminación durante la cosecha

La manipulación de los productos vegetales durante la cosecha es otra vía de contaminación. Los trabajadores están en contacto directo con el suelo y los productos agrícolas, de forma que si estos están contaminados puede haber transferencia del patógeno a sus manos y de ahí, a otros trabajadores, productos recolectados o herramientas que se utilizan durante la recolección ^[45].

4.2.3. Contaminación en la industria

Las ensaladas de cuarta gama, antes de ser envasadas en atmósfera protectora, son sometidas a una serie de operaciones en las que los vegetales son lavados, pelados y/o cortados y desinfectados. Estos procesos hacen que el producto final sea más propenso al deterioro microbiano (la vida útil de las ensaladas de cuarta gama es de, aproximadamente, una semana) y, además, no garantizan la completa eliminación de los patógenos ^[46]. Entre los vegetales que se incluyen en las ensaladas de cuarta gama, la lechuga es especialmente susceptible a la contaminación por *E. coli* O157:H7 debido a que, durante el troceado, se liberan fluidos del vegetal que proporcionan nutrientes al patógeno. Además, *E. coli* O157:H7 puede internalizarse en los tejidos vegetales durante el cultivo, quedando protegida de la desinfección superficial que se realiza posteriormente en la industria ^[47].

Después de ser recolectados, los vegetales pueden sufrir una contaminación secundaria durante el transporte si este no se realiza en las condiciones adecuadas. En la industria, el producto se puede contaminar durante las operaciones de procesado si se utiliza agua o utensilios contaminados, o durante el envasado si los envases o el equipo de envasado están contaminados. Incluso durante la distribución y comercialización del producto pueden surgir problemas si no se respetan las recomendaciones de almacenamiento o no se mantiene la cadena de frío ^[48].

Se considera que el problema crítico en la industria reside en que, cuando se higienizan los productos mediante lavado con agua y un desinfectante (habitualmente cloro), existe la posibilidad de contaminación cruzada de un lote contaminado a otro no contaminado si se utiliza la misma solución de lavado, ya que *E. coli* O157:H7 puede mantenerse viable en la misma, sobre todo en partículas y restos vegetales en suspensión. Debe tenerse en cuenta que la materia orgánica que se va aportando en cada lavado disminuye la eficacia del cloro como desinfectante, por lo que, si esta no se cambia con regularidad, se pierde eficiencia en la desinfección. Además, el agua contaminada es también una fuente de contaminación de utensilios y equipos industriales ^[49, 50].

4.2.4. Contaminación a nivel consumidor

Finalmente, cabe señalar el papel de la manipulación de las ensaladas de cuarta gama por parte de los consumidores. La seguridad de este tipo de productos puede verse comprometida si no se respeta la vida útil del producto o se rompe la cadena de frío. También pueden sufrir contaminación cruzada por contacto con otros alimentos, superficies o utensilios contaminados ^[46].

4.3. Medidas de prevención y control

Antes de que los vegetales destinados a la elaboración de ensaladas de cuarta gama lleguen a la industria para ser procesados, las empresas agrícolas que los producen disponen de planes de prevención para así evitar al máximo la contaminación en origen del producto. Estos planes incluyen, por ejemplo, la selección adecuada del campo de cultivo, teniendo en cuenta el uso previo de la parcela en cuestión, su proximidad a explotaciones ganaderas y características del terreno (como el potencial de escorrentía o la capacidad de absorción). También se tiene en cuenta el tipo de fertilizante utilizado (orgánico o mineral), la preparación y aplicación de este, los métodos de riego y el control de la calidad microbiológica del agua de riego para evitar riesgos por contaminación fecal de la misma ^[43].

Además, en la industria los trabajadores deben estar cualificados y formados en las Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura, con el fin de mantener en todo momento hábitos higiénicos de manipulación de alimentos (lavado de manos, ropa de trabajo, etc) y mantener limpias y desinfectadas las superficies, los equipos y los utensilios de trabajo, siguiendo el correspondiente plan de limpieza y desinfección ^[51].

Cabe destacar que, desde el momento en que los vegetales son recolectados en el campo de cultivo y llegan a la industria para ser procesados, todas las operaciones se realizan a temperatura de refrigeración (1°C - 5°C), así como su almacenamiento, distribución y venta, ya que esta temperatura inhibe el crecimiento de la mayoría de patógenos, incluida *E. coli* O157:H7, lo que evita que pueda multiplicarse en el alimento ^[4].

Para la higienización de los vegetales durante el procesamiento se suele utilizar agua con presencia de cloro libre (20-22 mg/l) debido a su bajo coste y facilidad de manipulación. Sin embargo, como hemos visto en apartados anteriores, este método puede no ser suficiente para eliminar por completo *E. coli* O157:H7 de los vegetales. Además, el cloro da lugar a subproductos halogenados potencialmente cancerígenos al reaccionar con la materia orgánica [50]. Por ello, existe un interés creciente para investigar métodos de desinfección alternativos, más sostenibles, eficaces y con menor riesgo tóxico para la población (Tabla 3). Además, el envasado de las ensaladas de cuarta gama una vez han sido higienizadas, se realiza en condiciones de atmósfera modificada (normalmente 85% nitrógeno, helio o argón, 10% dióxido de carbono y 5% oxígeno) para reducir la actividad de los microorganismos alterantes y patógenos aerobios, aunque en el caso de *E. coli* O157:H7 no parece tener un efecto tan significativo como la temperatura, ya que se trata de una bacteria anaerobia facultativa que puede crecer incluso en ausencia de oxígeno [49].

Tabla 3: métodos alternativos para la desinfección de ensaladas de cuarta gama ensayados frente a *E. coli* O157:H7.

Método	Referencia
Aceites esenciales (clavo y zataria)	[52]
Ácidos orgánicos (ácido acético 0.3-0.4% y ácido cítrico 1-1.4%)	[53]
Ácidos orgánicos y bioflavonoides de cítricos (Citrox©)	[54]
Cloro (200 ppm) combinado con ácido peroxiacético (80 ppm)	[55]
Ozono disuelto en agua (12 mg/L)	[56]
Luz pulsada (200-1000 nm, a 17.5 kJ/m ²)	[57]
Radiación Ultravioleta (200-280 nm, siendo 254 nm la más efectiva, a 0.2-20 kJ/m ²)	[6], [58]
Radiación Gamma (0.2 kGy)	[59]

Por último, cabe señalar que las ensaladas de cuarta gama deben cumplir los criterios microbiológicos establecidos en la normativa para este tipo de productos. Si bien estos criterios no incluyen el análisis del serotipo *E. coli* O157:H7 en particular, sí establecen, como criterio de higiene valores de referencia para la especie *E. coli* en su conjunto, con el fin de garantizar que el proceso de producción se lleva a cabo con las condiciones higiénico-sanitarias adecuadas [60].

4.4. Recomendaciones

En la tabla 4 se recogen las recomendaciones más importantes a implementar en los distintos puntos de la cadena de producción y consumo de las ensaladas de cuarta gama, con el fin de minimizar el riesgo de brotes por *E. coli* O157:H7.

Tabla 4: recomendaciones para evitar la contaminación de ensaladas de cuarta gama por *E. coli* O157:H7 [61, 62, 63].

Campo
<ul style="list-style-type: none">• Evitar el uso de agua de riego expuesta a contaminación fecal.• Habilitar canales para que corra el agua durante el riego y evitar la acumulación de materia orgánica.• Desarrollar un plan de gestión de estiércol y fertilizantes.• En estiércol compostado, separarlo del resto de fertilizantes y aplicar en la mayor brevedad posible.• En estiércol sin tratar, aplicar y esperar al menos 12 meses antes de plantar los vegetales.• Evitar el acceso de animales a la explotación.• Mantener utensilios, equipos y depósitos limpios, siguiendo las Buenas Prácticas Agrícolas.• En la recolección, realizar cortes limpios, separar y eliminar los descartes.
Industria
<ul style="list-style-type: none">• Disponer de un diseño adecuado de las instalaciones.• Disponer de un plan de APPCC.• Aplicar las Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura.• Controlar la carga efectiva del desinfectante.• Monitorizar el tiempo de lavado y desinfección.• Comprobar que haya un correcto envasado de los productos.• Deben respetarse las condiciones de temperatura y humedad durante el almacenamiento y transporte.
Consumidor
<ul style="list-style-type: none">• No comprar productos pasados de fecha ni dañados.• Conservar el producto en frío, respetando la vida útil y recomendaciones del fabricante.• Evitar la contaminación cruzada con otros alimentos.• Mantener la higiene personal y del entorno.

5. CONCLUSIONES

- A pesar de que la incidencia de *E. coli* O157:H7 por consumo de ensaladas de cuarta gama es relativamente baja, conviene reforzar las acciones preventivas en este tipo de productos, ya que se trata de un patógeno emergente cuya infección puede acarrear graves consecuencias para la salud de los consumidores.
- Las medidas preventivas para reducir el riesgo de infección deben comenzar durante el cultivo de los vegetales, prestando especial atención a la calidad del agua de riego y a la utilización de fertilizantes orgánicos, ya que estas son las principales fuentes de contaminación primaria del producto.
- En la industria se deben aplicar las Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura. Una estricta higienización del producto y la refrigeración a bajas temperaturas son fundamentales para minimizar el riesgo de infección por *E. coli* O157:H7.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Mritunjay, S. K., & Kumar, V. (2017). A study on prevalence of microbial contamination on the surface of raw salad vegetables. *3 Biotech*, 7(1), 13.
2. Said, D. E. S. (2012). Detection of parasites in commonly consumed raw vegetables. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(4), 345-352.
3. Calero, F. A. (2018). Las industrias de IV gama. Generalidades Hortalizas mínimamente procesadas (<https://www.bibliotecahorticultura.com/wp-content/uploads/2018/08/ART%C3%89S-CALERO-Francisco.-Febrero-2018.-Las-industrias-de-IV-gama.-Generalidades.-Hortalizas-m%C3%ADnimamente-procesadas-TC.pdf>).
4. Corbo, M. R., Speranza, B., Campaniello, D., D'amato, D., & Sinigaglia, M. (2010). Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 2, 1143-1154.
5. Althaus, D., Hofer, E., Corti, S., Julmi, A., & Stephan, R. (2012). Bacteriological survey of ready-to-eat lettuce, fresh-cut fruit, and sprouts collected from the Swiss market. *Journal of food protection*, 75(7), 1338-1341.
6. Mir, S. A., Shah, M. A., Mir, M. M., Dar, B. N., Greiner, R., & Roohinejad, S. (2018). Microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salads in developing countries and potential solutions in the supply chain to control microbial pathogens. *Food Control*, 85, 235-244

7. Weldezgina, D., & Muleta, D. (2016). Bacteriological contaminants of some fresh vegetables irrigated with Awetu River in Jimma Town, Southwestern Ethiopia. *Advances in Biology*, 2016.
8. Abougrain, A. K., Nahaisi, M. H., Madi, N. S., Saied, M. M., & Ghenghesh, K. S. (2010). Parasitological contamination in salad vegetables in Tripoli-Libya. *Food control*, 21(5), 760-762.
9. Rahman, J., Talukder, A. I., Hossain, F., Mahomud, S., Islam, M. A., & Shamsuzzoha, M. (2014). Detection of Cryptosporidium oocysts in commonly consumed fresh salad vegetables. *American Journal of Microbiological Research*, 2(6), 224-226.
10. Pagadala, S., Marine, S. C., Micallef, S. A., Wang, F., Pahl, D. M., Melendez, M. V., Kline W. L., Oni R. A., Walsh C. S., Everts K. L., & Buchanan, R. L. (2015). Assessment of region, farming system, irrigation source and sampling time as food safety risk factors for tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 98-108.
11. Maffei, D. F., Alvarenga, V. O., Sant'Ana, A. S., & Franco, B. D. (2016). Assessing the effect of washing practices employed in Brazilian processing plants on the quality of ready-to-eat vegetables. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 474-481.
12. Eraky, M. A., Rashed, S. M., Nasr, M. E. S., El-Hamshary, A. M. S., & Salah El-Ghannam, A. (2014). Parasitic contamination of commonly consumed fresh leafy vegetables in Benha, Egypt. *Journal of parasitology research*, 2014.
13. De Oliveira, M. A., De Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., & De Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400-1403.
14. Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., & Bietlot, H. (2016). Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control*, 67, 225-234.
15. Ferens, W. A., & Hovde, C. J. (2011). Escherichia coli O157: H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne pathogens and disease*, 8(4), 465-487.
16. Wang, F., Yang, Q., Kase, J. A., Meng, J., Clotilde, L. M., Lin, A., & Ge, B. (2013). Current trends in detecting non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli in food. *Foodborne pathogens and disease*, 10(8), 665-677.
17. Rahal, E. A., Kazzi, N., Nassar, F. J., & Matar, G. M. (2012). Escherichia coli O157: H7—Clinical aspects and novel treatment approaches. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 138.
18. Torres Armendáriz, V., Manjarrez Domínguez, C. B., Acosta-Muñiz, C. H., Guerrero-Prieto, V. M., Parra-Quezada, R. Á., Noriega Orozco, L. O., & Ávila-Quezada, G. D. (2016). Interacciones entre Escherichia coli O157: H7 y plantas comestibles. ¿Se han desarrollado mecanismos de internalización bacteriana? *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 64-83.
19. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Salud pública de México*, 44, 464-475.

20. Rudolph, M. J., Davis, S. A., Tumer, N. E., & Li, X. P. (2020). Structural basis for the interaction of Shiga toxin 2a with a C-terminal peptide of ribosomal P stalk proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 295(46), 15588-15596.
21. Carter, M. Q., Pham, A., Du, W. X., & He, X. (2021). Differential induction of Shiga toxin in environmental *Escherichia coli* O145: H28 strains carrying the same genotype as the outbreak strains. *International Journal of Food Microbiology*, 339, 109029.
22. Jokiranta, T. S. (2017). HUS and atypical HUS. *Blood*, 129(21), 2847-2856.
23. Felício, M. D. S., Hald, T., Liebana, E., Allende, A., Hugas, M., Nguyen-The, C., Johannessen G. S., Niskanen T., Uyttendaele M., & McLauchlin, J. (2015). Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: initial evaluation using outbreak data (2007–2011). *International journal of food microbiology*, 195, 9-19.
24. Huerta-González, N. (2020). *Escherichia Coli*. Una revisión bibliográfica (<https://revistamedica.com/escherichia-coli-revision-bibliografica/>).
25. Foodborne Illness Outbreak Database. 2019 Multi-province Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce Grown in Salinas (<http://outbreakdatabase.com/details/2019-multi-province-outbreak-of-e.-coli-o157h7-infections-linked-to-romaine-lettuce-grown-in-salinas/?>).
26. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE). 2006.
27. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce (FINAL UPDATE). 2012.
28. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Organic Spinach and Spring Mix Blend (Final Update). 2012.
29. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Costco Rotisserie Chicken Salad (Final Update). 2015.
30. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 Infections Linked to Alfalfa Sprouts Produced by Jack & The Green Sprouts (Final Update). 2016.
31. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Leafy Greens (Final Update). 2017.
32. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Multistate Outbreak of *E. coli* O157:H7 Infections Linked to Romaine Lettuce (Final Update). 2018.
33. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Fresh Express Sunflower Crisp Chopped Salad Kits. 2020.
34. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Romaine Lettuce. 2020.
35. CDC: Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *E. coli* Infections Linked to Leafy Greens. 2020.

36. Friesema, I., Sigmundsdottir, G., Van Der Zwaluw, K., Heuvelink, A., Schimmer, B., De Jager, C., & Van Pelt, W. (2008). An international outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 infection due to lettuce, September–October 2007. *Eurosurveillance*, 13(50), 19065.
37. Jenkins, C., Dallman, TJ and Grant, KA (2019). Impact of whole genome sequencing in the investigation of foodborne outbreaks of the serogroup O157: H7 of Shiga toxin producing *Escherichia coli*, England, 2013 to 2017. *EuroSurveillance*, 24 (4), 1800346.
38. Julien-Javaux, F., Gérard, C., Campagnoli, M. y Zuber, S. (2019). Estrategias para la gestión de la seguridad de los productos frescos desde el campo hasta la mesa. *Current Opinion in Food Science*, 27, 145-152.
39. Boletín Oficial del Estado (2007). Real Decreto 1620/2007, de 7 diciembre por el que se establece el régimen jurídico de la reutilización de las aguas depuradas. *N*, 294, 50639.
40. Park, S., Szonyi, B., Gautam, R., Nightingale, K., Anciso, J., & Ivanek, R. (2012). Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review. *Journal of food protection*, 75(11), 2055-2081.
41. Erickson, M. C., Liao, J., Payton, A. S., Riley, D. G., Webb, C. C., Davey, L. E., Kimbrell S., Ma L., Zhang G., Flitcroft I., Doyle M. P., & Beuchat, L. R. (2010). Preharvest internalization of *Escherichia coli* O157: H7 into lettuce leaves, as affected by insect and physical damage. *Journal of food protection*, 73(10), 1809-1816.
42. Roslev, P., & Bukh, A. S. (2011). State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1341-1355.
43. Gil, M. I., Selma, M. V., Suslow, T., Jacxsens, L., Uyttendaele, M., & Allende, A. (2015). Pre-and postharvest preventive measures and intervention strategies to control microbial food safety hazards of fresh leafy vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(4), 453-468.
44. Bozkurt, H., Bell, T., van Ogtrop, F., Phan-Thien, K. Y., & McConchie, R. (2021). Assessment of microbial risk during Australian industrial practices for *Escherichia coli* O157: H7 in fresh cut-cos lettuce: A stochastic quantitative approach. *Food Microbiology*, 95, 103691.
45. Mogren, L., Windstam, S., Boqvist, S., Vågsholm, I., Söderqvist, K., Rosberg, A. K., Lindén J., Mulaosmanovic E., Krlsson M., Uhlig E., Håkansson Å., & Alsanius, B. (2018). The hurdle approach—A holistic concept for controlling food safety risks associated with pathogenic bacterial contamination of leafy green vegetables. A review. *Frontiers in microbiology*, 9, 1965.
46. Machado-Moreira, B., Richards, K., Brennan, F., Abram, F., & Burgess, C. M. (2019). Microbial contamination of fresh produce: what, where, and how?. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(6), 1727-1750.
47. World Health Organization. (2008). *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: meeting report* (Vol. 14). World Health Organization.

48. Vital, P. G., Rivera, W. L., Abello, J. J. M., & Francisco, J. C. E. (2019). Microbiological assessment of fresh, minimally processed vegetables from open air markets and supermarkets in Luzon, Philippines, for food safety. *Environment, Development and Sustainability*, 21(1), 51-60.
49. Taban, B. M., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, 17(6), 286-287.
50. Abnavi, M. D., Alradaan, A., Munther, D., Kothapalli, C. R., & Srinivasan, P. (2019). Modeling of Free Chlorine Consumption and Escherichia coli O157: H7 Cross-Contamination During Fresh-Cut Produce Wash Cycles. *Journal of food science*, 84(10), 2736-2744.
51. Gómez-López, V. M., Lannoo, A. S., Gil, M. I., & Allende, A. (2014). Minimum free chlorine residual level required for the inactivation of Escherichia coli O157: H7 and trihalomethane generation during dynamic washing of fresh-cut spinach. *Food Control*, 42, 132-138.
52. Azizkhani, M., Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M. V., & Aznar, R. (2013). Comparative efficacy of Zataria multiflora Boiss., Origanum compactum and Eugenia caryophyllus essential oils against E. coli O157: H7, feline calicivirus and endogenous microbiota in commercial baby-leaf salads. *International journal of food microbiology*, 166(2), 249-255.
53. Al-Rousan, W. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Ajo, R. Y., & Holley, R. A. (2018). Use of acetic and citric acids to inhibit Escherichia coli O157: H7, Salmonella Typhimurium and Staphylococcus aureus in tabbouleh salad. *Food microbiology*, 73, 61-66.
54. Tsiraki, M. I., Yehia, H. M., Elobeid, T., Osaili, T., Sakkas, H., & Savvaidis, I. N. (2018). Viability of and Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes in a delicatessen appetizer (yogurt-based) salad as affected by citrus extract (Citrox©) and storage temperature. *Food microbiology*, 69, 11-17.
55. Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Obaidat, H. M., Shaker, R. R., Awaisheh, S. S., & Holley, R. A. (2014). Inactivation of stressed Escherichia coli O157: H7 cells on the surfaces of rocket salad leaves by chlorine and peroxyacetic acid. *Journal of food protection*, 77(1), 32-39.
56. Karaca, H., & Velioglu, Y. S. (2020). Effects of ozone and chlorine washes and subsequent cold storage on microbiological quality and shelf life of fresh parsley leaves. *LWT*, 127, 109421.
57. Manzocco, L., Ignat, A., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., & Nicoli, M. C. (2015). Water saving in fresh-cut salad washing by pulsed light. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 47-51.
58. Millán Villarroel, D., Romero González, L., Brito, M., & Ramos-Villarroel, A. Y. (2015). Luz ultravioleta: inactivación microbiana en frutas. *Saber*, 27(3), 454-469.
59. Suárez, R. (2001). Conservación de alimentos por irradiación. *Invenio*, 4(6), 85-124.

60. Reglamento (CE) No 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) No 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de Unión Europea*, 322(3), 12-29
61. European Commission: EC. (2017). Commission notice on guidance document on addressing microbiological risks in fresh fruits and vegetables at primary production through good hygiene. *Off. J. Eur. Union C*, 163, 1-40.
62. Garcia, G., & Vázquez, L. (2015). Guía de prácticas correctas de higiene para vegetales y derivados, frescos, mondados, troceados o envasados. *Barcelona: Agencia de Salud Pública de Catalunya*.
63. AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Frutas y verduras siempre seguras (http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/frutas_verduras.htm).