

Control de riesgos microbiológicos en la elaboración de vegetales listos para ser consumidos

Microbiological risk control in the production of ready-to-eat vegetables

Controle de riscos microbiológicos na elaboração de vegetais prontos para o consumo

Pellicer K¹, <https://orcid.org/0009-0006-9891>, Hugo A² <https://orcid.org/0000-0003-2707-876>, Vallejos S¹ <https://orcid.org/0009-0001-0470-6858>, Schiaffino C³ <http://orcid.org/0009-0004-4121-060x>, Copes J¹ <http://orcid.org/0009-0007-0571-8096>

¹ Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Av. 60 y 118, B1900 La Plata, Provincia de Buenos Aires

² Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CIDCA) CONICET-CIC-UNLP. calle 47 esq.116 - La Plata, Buenos Aires, Argentina (CP 1900)

³ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Cátedra Bromatología y Tecnología de Alimentos. Calle 5 esq. 116, General Pico, La Pampa.

Correo electrónico: pellicerk@fcv.unlp.edu.ar
DOI: <https://doi.org/10.19137/cienvet.v27.9271>

Fecha de recibido: 24 de julio de 2025 **Fecha de aceptado para su publicación:** 7 de noviembre de 2025

Resumen

Con el objetivo de garantizar la inocuidad de las ensaladas servidas en los menús del Comedor Universitario, se estudió la calidad microbiológica de la materia prima. Se analizaron 200 muestras (80 de lechuga, 40 de tomate, 40 de repollo, y 40 de zanahoria) siguiendo la metodología oficial (Recuento de Aerobios Mesófilos, NMP/g de *Escherichia coli*, detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* productora de toxina SHIGA (STEC) O157, *E. coli* STEC no O157 y *Shigella* spp.). Se aislaron tres cepas de *Listeria monocytogenes* (una de repollo y dos de lechuga), dos *L. seeligeri*, cinco *L. welshimeri* y una *L. ivanovii*. Una cepa de *Salmonella* y una de *Shigella flexneri*, ambas provenientes de lechuga. Se aislaron 2 cepas de *E. coli* O157 provenientes de repollo (1 cepa positiva a *stx*₁, y la otra cepa positiva a *stx*₂). Tres aislamientos de STEC no O157:



una cepa O45 positiva a *stx*₂ de zanahoria, una cepa O145 positiva a *stx*₁ y a *stx*₂ de zanahoria, y una cepa serotipo O45 positiva a *stx*₂ de lechuga. Los recuentos de mesófilos fueron entre 10⁵ y 10⁸ UFC/g para repollo y zanahoria, 10² a 10⁷ UFC/g en tomate y entre 10³ y 10⁷ UFC/g para lechuga. Los recuentos de *E. coli* superaron los límites permitidos en 14 muestras. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad del control en la recepción de materia prima, planificación de una estrategia de saneamiento y control posterior.

Palabras clave: inocuidad, vegetales mínimamente procesados, buenas prácticas de manufactura, patógenos transmitidos por alimentos

Abstract

To ensure the safety of the salads served in the University Cafeteria menus, the microbiological quality of the raw materials was studied. Two hundred samples (80 lettuce, 40 tomato, 40 cabbage, and 40 carrot) were analyzed following the official methodology (Mesophilic Aerobic Count, MPN/g of *Escherichia coli*, detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* STEC O157, *E. coli* STEC non-O157, and *Shigella* spp.). Three strains of *Listeria monocytogenes* were isolated (one from cabbage and two from lettuce), two of *L. seeligeri*, five of *L. welshimeri*, and one strain of *L. ivanovii*. One strain of *Salmonella* and one strain of *Shigella flexneri*, both from lettuce. Two strains of *E. coli* O157 strains were isolated from cabbage, one *stx*-1 positive, and the other *stx*-2 positive. Three non-O157 STEC were isolated: a *stx*-2 positive O45 strain from carrots, and *stx*-1 and *stx*-2 positive O145 strain from carrots, and an *stx*-2 positive serotype O45 strain from lettuce. Mesophilic counts ranged from 10⁵ to 10⁸ CFU/g for cabbage and carrots, 10² to 10⁷ CFU/g for tomatoes, and from 10³ to 10⁷ CFU/g for lettuce. *E. coli* counts exceeded the permissible limits in 14 samples. These data highlight the need for control upon receipt of raw materials, planning a sanitation strategy, and subsequent safety control.

Keywords: food safety, minimally processed vegetables, good manufacturing practices, foodborne pathogens

Resumo

Com o objetivo de garantir a inocuidade das saladas servidas nos menus do Restaurante Universitário, foi estudada a qualidade microbiológica da matéria-prima. Foram analisadas 200 amostras (80 de alface, 40 de tomate, 40 de repolho e 40 de cenoura), seguindo a metodologia oficial Contagem de Aeróbios Mesófilos, NMP/g de *Escherichia coli*, detecção de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* STEC O157, *E. coli* STEC não O157 e *Shigella* spp. Três cepas de *Listeria monocytogenes* foram isoladas (uma de repolho e duas de alface), duas de *L. seeligeri*, três de *L. welshimeri* e uma cepa de *L. ivanovii*. Uma cepa de *Salmonella* e uma de *Shigella flexneri*, ambas de alface. Duas cepas de *E. coli* O157 foram isoladas de repolho, uma positiva para *stx*-1 e a outra positiva para *stx*-2. Três STEC não-O157 foram isolados: uma cepa O45 positiva para *stx*-2 de cenouras, uma cepa O145 positiva para *stx*-1 e *stx*-2 de cenouras e uma cepa O45 positiva

para stx-2 de alface. (As contagens de mesófilos variaram de 10^5 a 10^8 UFC/g para repolho e cenoura, 10^2 a 10^7 UFC/g para tomates e entre 10^3 e 10^7 UFC/g para tomates e entre 10^3 e 10^7 UFC/g para alface.) As contagens de *E. coli* excederem os limites permitidas em 14 amostras. Esses resultados evidenciam a necessidade de controle na recepção de materia-prima, do planejamento de uma estratégia de higienização e de monitoramento posterior

Palavras-chave: inocuidade, vegetais minimamente processados, boas práticas de fabricação, patógenos transmitidos por alimentos.

Introducción

El incremento en la demanda de alimentos de elaboración rápida, simple y saludables constituye uno de los grandes desafíos de la industria alimentaria, principalmente representado por los productos frescos mínimamente procesados y listos para el consumo. Entre ellos los productos vegetales mínimamente procesados, denominados vegetales de IV-gama ⁽¹⁾. El hecho de presentar indicadores de contaminación y bacterias patógenas convierte a las materias primas de origen vegetal en productos con una inadecuada calidad sanitaria para la elaboración de alimentos LPC, que por deficiencias en la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) podrían ser causales de ETA ^(2,3).

En el **Comedor Universitario de la UNLP** se elaboran 9500 raciones diarias bajo un sistema operativo estandarizado. La elaboración de alimentos vegetales mínimamente procesados, inocuos y con la calidad solicitada, plantea un importante reto para la seguridad alimentaria. La materia prima puede estar contaminada con peligros biológicos, en especial las bacterias patógenas tales como *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp. Las exigencias reglamentarias del Código Alimentario Argentino ⁽⁴⁾ establecen en el Artículo 925 *quater* los límites microbiológicos para hortalizas frescas (*E. coli* NMP/g: n=5, c=2, m=10, M=100; *Salmonella* spp.: ausencia en 25 g; *E. coli* O157: H//NM: ausencia en 25g; *E. coli* no O157: ausencia en 25g), (16). De las cepas de *E. coli* productor de toxina Shiga el CAA contempla los siguientes serogrupos: O145, O121, O26, O111 y O103, teniendo en cuenta sólo los aislamientos positivos para los genes stx, eae, de los serogrupos mencionados.

Con el fin de producir alimentos LPC (ensaladas) inocuos y de calidad para la comunidad universitaria que almuerza en el Comedor Universitario, este trabajo busca conocer la calidad microbiológica de las materias primas: determinar el RAM (recuento de aerobios mesófilos) como indicadores de contaminación, el número más probable NMP/g de *E. coli*, y la presencia/ausencia de bacterias patógenas como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., y STEC O157 y STEC no O157 (O45, O145, O121, O26, O111 y O103) positivas stx.

Materiales y Métodos

Entre septiembre 2023 a diciembre 2024 se realizaron 10 muestreos de 20 muestras cada uno, de lechuga, repollo, zanahoria y tomate, de las materias primas recepcionadas en el Comedor Universitario Universidad Nacional de La Plata, UNLP que provienen del mercado regional que es el centro de distribución a donde llevan sus cosechas los productores del Cinturón Frutihortícola Platense. El muestro se realizó de acuerdo al siguiente detalle:

Lechuga: se tomó un *pool* de muestras de hojas de lechuga de 4 cajones diferentes; cada muestra conformada por 25 g de hojas (100 g totales por cada *pool*). Total: 8 muestras (25 g c/u) en 2 *pools* de 100 g c/u para cada muestreo.

Repollo: un *pool* de muestras de hojas de repollo de 4 cajones diferentes; cada muestra se conformó por 25 g de hojas (100 g totales por cada *pool*). Total 4 muestras por día en 1 *pool* de 100g.

Zanahorias: se tomó un *pool* de 4 muestras de superficie de 4 bolsas diferentes (100 gramos por cada *pool*), cada muestra conformada por 25 g de la superficie externa, utilizando un pelador estéril (100 g cada *pool*). Total 4 muestras por día en 1 *pool* de 100g.

Tomate: se recogió un *pool* de 4 muestras de 4 cajones diferentes (100 gramos por cada *pool*); cada muestra conformada por 25 g de la superficie externa, utilizando un cuchillo estéril (100 g cada *pool*). Total 4 muestras por día en 1 *pool* de 100g.

Las muestras recolectadas en bolsas de polietileno estériles, se transportaron en forma refrigerada al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP para su procesamiento dentro de las 12 horas.

Se realizó una dilución 1/1 con solución fisiológica estéril (SF) con cada *pool* de muestras (100 g/100 ml), seguido se aplicaron 2 minutos de homogenizador de palas tipo *Stomacher* (Bagmixer, Interscience). Posteriormente se realizó la dilución correspondiente a cada marcha bacteriológica según los métodos oficiales como se detalla en el Manual de Análisis Microbiológicos de los Alimentos ANMAT Recuento de Aerobios Mesófilos (RAM), determinación del NMP/g de *Escherichia coli*, detección de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., STEC O157 y no O157 (O45, O145, O121, O26, O111 y O103) positivas *stx* según metodología analítica oficial ^(5,6).

-Técnica de recuento en placa de aerobios mesófilos según ISO 4833-2: 2013. Método horizontal para el recuento de Microorganismos Parte II: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie

-Determinación del Número Más Probable/g de *E. coli*: Bacteriological Analytical Manual (BAM) Capítulo 4 Enumeración de *E. coli* y bacterias coliformes, octubre de 2020.

-Detección de *Salmonella* spp.: Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp en alimentos ISO 6579 en agar XLD (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) y Hektoen (Biokar, Paris, Francia).

- Detección de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Microbiología de la cadena alimentaria: método horizontal para la detección y enumeración de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 1: Método de detección. ISO 11290-1: 2017 y se utilizó agar PALCAM (Difco, BD (Becton, Dickinson and Company)).

-Detección de *Shigella* spp. Bacteriological Analytical Manual (BAM) Capítulo 6: *Shigella* con la utilización de caldo *Shigella* con novobiocina (Acumedia; Neogen Lansing, Michigan, USA) y agar Mc Conkey (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido).

-Detección de *E. coli* STEC O157 ISO 16654:2001 Microbiología de alimentos: método horizontal para la detección de *E. coli* O157, se realizó la inmunocaptura mediante la técnica de separación con perlas Inmunomagnética (Neogen, Lansing, Michigan, USA) y siembra en agar Mc Conkey sorbitol (Britania, CABA, Argentina) con cefixima telurito (Biokar, Paris, Francia).

-Detección de *E. coli* STEC no O157 (serogrupos O45, O145, O121, O26, O111 y O 103), se siguieron los pasos de la norma ISO 16654:2001 y del caldo de enriquecimiento TSBm con novobiocina (Acumedia; Neogen Lansing, Michigan, USA) se realizó la inmunocaptura mediante la técnica de separación con perlas Inmunomagnética SDIX no O157 STEC inmunomagnetic separation (Sigma, St. Louis USA). A todas las cepas de *E. coli* STEC aisladas se realizó PCR en tiempo real para la detección de los genes *stx*₁ y *stx*₂.

Resultados

En relación con la detección de patógenos se han aislado tres cepas *Listeria monocytogenes* (una de repollo y dos de lechuga), y dos cepas de *Listeria seeligeri* (una de lechuga y una de tomate), tres cepas *L. welshimeri* (dos de lechuga y una de repollo), dos cepas de *L. ivanovii* (una de lechuga y otra de repollo). Una cepa de *Salmonella* de una muestra de lechuga, y una cepa de *Shigella flexneri* de una muestra de lechuga.

Se aislaron 2 cepas de *E. coli* O157: 1 cepa de repollo positiva a *stx*₁, y la otra muestra de repollo a *stx*₂.

De las marchas bacteriológicas para la detección de *E. coli* no O157, se determinaron una cepa O45 positiva a *stx*₂ de zanahoria, una cepa serotipo O145 positiva a *stx*₁ y a *stx*₂ aislada de zanahoria, y una cepa serotipo O45 positiva a *stx*₂ aislada de lechuga.

La determinación del NMP/g de *Escherichia coli* arrojó los siguientes resultados

-Tomate: una muestra tomada en época de clima cálido y lluvioso obtuvo un recuento superior a 4 NMP/g, el resto de las muestras arrojó resultados inferiores a 3 NMP/g;

-Repollo: dos muestras mostraron valores de 9 NMP/g y el resto de los resultados fueron inferiores a 3 NMP/g;

-Zanahoria: dos muestras mostraron un valor mayor a 9 NMP/g, una muestra mostró un valor de 4 NMP/g y el resto de los resultados fueron inferiores a 3 NMP/g;

-Lechuga: 5 muestras obtuvieron valores superiores a 23 NMP/g, dos muestras superiores a 9 NMP/g, una muestra superior a 4 NMP/g, y el resto de los resultados fueron inferiores a 3 NMP/g.

Los valores inferiores de *E. coli* se obtuvieron en los muestreos que coincidieron con los meses en que las temperaturas fueron más bajas. De cada uno de los tubos positivos de confirmación se logró aislar la cepa de *E. coli* correspondiente (14 cepas).

Los recuentos de mesófilos arrojaron resultados entre 10^5 y 10^8 UFC/g para repollo, entre 10^4 y 10^7 para zanahoria, mientras que tomate fue 10^2 a 10^7 UFC/g y para lechuga entre 10^3 y 10^7 UFC/g. Los valores más bajos coinciden con los muestreos que fueron en época invernal y con escasas precipitaciones (mayo-junio).

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelaron que el 5% de las muestras eran positivas para *Listeria*. La mayoría de los aislamientos correspondieron a lechuga. Hallazgos similares fueron encontrados por otros autores en nuestro país donde aislaron *L. monocytogenes* en el 25% de los vegetales mínimamente procesados⁽⁷⁾. Aunque el CAA establece la obligatoriedad de ausencia de *Listeria* spp. sólo en vegetales congelados y supercongelados desde 2020⁽⁴⁾, resulta importante remarcar el riesgo elevado que significa su presencia en la materia prima vegetal destinada a la elaboración de productos listos para ser consumidos.

En un estudio anterior sobre 50 ensaladas cortadas frescas para la venta en la ciudad de La Plata encontró que el 88% no estaban en condiciones de higiene y seguridad requeridas para el consumo humano debido a que superaron el recuento de coliformes fecales permitido por la reglamentación, del 64% de las mismas se aisló *Escherichia coli* y del 2% *Listeria monocytogenes*⁽²⁾. De la misma manera esto concuerda con un reporte de Colombia en el que se aisló *L. monocytogenes* en el 11% de un total de 600 muestras de alimentos LPC analizadas⁽⁸⁾; Aunque estos estudios evaluaron alimentos LPC y no se definió el origen de la contaminación de estos productos con *Listeria*, los hallazgos del presente trabajo refuerzan la necesidad de implementar un buen procedimiento de lavado y desinfección de las materias primas que se utilizan en su elaboración.

Respecto a *E. coli* se encontró que el 7% de las muestras superó el límite permitido (>23 NMP/g) por el CAA. Todas las muestras que superaron el límite pertenecían a lechuga y correspondían a En Venezuela y Guatemala estudios similares mostraron una alta incidencia de coliformes y

patógenos en vegetales tipo hoja, encontraron que el 81,33% de las muestras presentaron recuentos de coliformes totales entre 10^3 y 10^5 UFC/g, con una recuperación de *E. coli* fue de 10% y, un 28% resultaron positivas a enteropatógenos como *Aeromonas*, *Salmonella* y *E. coli*^(9,3). *E. coli* y *Enterococcus fecalis* han sido aislado en números muy elevados en Colombia si se compara con la normativa argentina, de ensaladas listas para comer⁽¹⁰⁾.

Las dos cepas de *E. coli* O157 encontradas fueron aisladas de muestras de repollo recolectadas en meses de elevada temperatura y humedad (marzo y noviembre respectivamente). Las cepas de *E. coli* no O157 aisladas de zanahoria y de lechuga, también pertenecían a la misma época del año.

La cepa de *Salmonella* spp. y la de *Shigella flexneri* que fueron aisladas de muestras de lechuga coincidieron también con los meses de elevada temperatura y humedad (marzo). Otros autores no han detectado *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 y no O157 STEC en muestras de vegetales crudos y LPC en nuestro país.⁽⁷⁾ Estas diferencias podrían deberse a la época del año del muestreo y la calidad de origen de las materias primas

Shigella spp. no está contemplada dentro de los criterios microbiológicos establecidos por el CAA para materia primas vegetales y vegetales mínimamente procesados. Sin embargo, este patógeno, estuvo entre los cuatro principales agentes etiológicos en brotes de ETA causados por ensaladas de hojas verdes en USA⁽¹¹⁾, y en Argentina es uno de los principales agentes causales de diarreas bacterianas⁽¹²⁾. La presencia de *Shigella* spp. en las muestras de lechuga analizadas revela la importancia de la búsqueda de este patógeno. Ha sido reportado el riesgo que implica su aislamiento⁽¹³⁾, incluso otros autores han encontrado *Shigella* en el 8,1% de vegetales LPC estudiados⁽¹⁴⁾.

De los vegetales analizados el que presentó mayor porcentaje de aislamientos positivos de patógenos fue la lechuga. También fue el único producto vegetal que superó durante algunos meses del año la carga microbiológica de *E. coli* permitida. Por lo expuesto, se remarca el énfasis necesario en su lavado y desinfección al momento de preparar vegetales mínimamente procesados ya que presenta un riesgo mayor de contaminación.

Conclusiones

Debido a la carga microbiológica que presenta la materia prima, el riesgo de que por deficiencias en la aplicación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por ejemplo contaminación cruzada a través de las manos de operarios o utensilios estos gérmenes puedan llegar al LPC (ensalada) es muy elevado.

La implementación de Buenas prácticas en toda la cadena de elaboración de vegetales mínimamente procesados resulta indispensable debido a la presencia de microorganismos patógenos relacionados con diarreas bacterianas.

Bibliografía

1. Matiacevich S, Riquelme N & Arancibia C. Perspectivas de las tecnologías aplicadas en productos de IV-Gama. *Contribuciones Científicas y Tecnológicas* ; 2016:41.
2. Pellicer K, Copes J, Malvestiti L, Echeverría G, Noretto E, Stanchi N. Ready to eat salads. An análisis of health and safety conditions. *Analecta Veterinaria*; 2002: 22 (1): 4-6.
3. Rodríguez de León, A. Determinación de *Escherichia coli* en ensaladas a base de lechuga preparadas en restaurantes de comida rápida. Informe de tesis de grado Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. 2005. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2278.pdf
4. Código Alimentario Argentino: Capítulo XI Alimentos Vegetales, art 925 bis, tris y quater. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/codigoa/Capitulo_XI.pdf
5. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Manual de análisis microbiológico de los alimentos – microorganismos patógenos - volumen I. Ministerio de Salud. 2013. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf
6. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Microorganismos indicadores volumen III. 2014. Disponible en http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf
7. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica) Programa Federal de Vigilancia de Contaminantes Químicos y Biológicos, 2018: p.12.
8. Muñoz AI, Vargas M, Otero L, Díaz G, Guzmán V Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D. C., 2002-2008. *Biomédica* 2011; 31:428-439.
9. Rincón V G, Ginestre P M, Romero AS, Castellano GM, Ávila RY. Calidad microbiológica y bacterias enteropatógenas en vegetales tipo hoja. *Kasmera*, 2010: 38(2), 97-105. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000200002&lng=es&tlng=es.
10. Alvarado K, Echeverry L, Lizarazo T, García Vesga A. Repercusión de las condiciones sanitarias y conductas de consumo de ensaladas en la aparición de patógenos causantes de enfermedades gastrointestinales en los Restaurantes Polo y La Novena, en Bogotá, Colombia REDVET. *Rev Electron Vet* 2017; 10: (1-35) *Veterinaria Organización Málaga, España*
11. Herman KM, Hall AJ and Gould LH. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973–2012. *Epidemiology and Infection*, 2016:143(3011–3021).
12. ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica). Ficha Técnica N° 6. Shigelosis. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Disponible en: <http://www.anmat.gov.ar/webanmat/publicaciones/shigelosis.pdf>
13. Brusa V, Magdalena Costa JM, Oteiza L, Galli PA, Barril GA, Leotta and Signorini M. Prioritization of vegetable-borne biological hazards in argentina using a multicriteria decision analysis tool. *Food Science and Technology International* 2024. 30(7) 680–696. DOI: 10.1177/10820132231180640

14. Anselmo RJ, Ojeda PA and Barrios HA (2020) Detección y susceptibilidad antimicrobiana de *Shigella* spp. en ensaladas preparadas, listas para consumir. *Información Tecnológica* 31: 13-20.

Conflicto de intereses: los autores declaran la ausencia de potenciales conflictos de intereses respecto de la investigación, autoría o la publicación del presente artículo.

CrediT: Todos los autores contribuyeron a la concepción y el diseño del estudio, preparación del material, la recopilación y el análisis de datos. Todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.