



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A CONDICIONES
DE ESTRÉS DE CEPAS DE *Salmonella enterica* serovar Enteritidis
AISLADAS DESDE HUMANOS, GAVIOTAS Y AVES
COMERCIALES

MARCELA FRESNO RAMÍREZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A CONDICIONES
DE ESTRÉS DE CEPAS DE *Salmonella enterica* serovar Enteritidis
AISLADAS DESDE HUMANOS, GAVIOTAS Y AVES
COMERCIALES

MARCELA FRESNO RAMÍREZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL MERINO
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO ÁBALOS PINEDA
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR HIDALGO OLATE

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor guía, Dr. Patricio Retamal, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de hacer esta memoria de título, por la confianza entregada y la paciencia frente a mis incontables dudas a lo largo del desarrollo de la memoria. Gracias por los consejos, críticas y sugerencias, y especialmente por ayudarme a orientar mi camino de ahora en adelante.

A mis profesores consejeros, Dr. Pedro Ábalos y Héctor Hidalgo, por sus consejos y correcciones de esta memoria, la cual no sería lo mismo sin Uds.

A todos los funcionarios del Dpto. de Medicina Preventiva Animal, muchas gracias por su ayuda, sin la cual no habría sido posible desarrollar este estudio.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia, especialmente a mis padres, por permitir que estudiara esta carrera y apoyarme a lo largo de ella. Quiero agradecer a mi pololo, por estar siempre conmigo y apoyarme frente a todo. También quiero agradecer a mis amigos, que me acompañaron durante todo el camino, dándome su apoyo incondicional, siempre los recordaré con muchísimo cariño.

DETERMINACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA A CONDICIONES DE ESTRÉS DE CEPAS DE *Salmonella enterica* serovar Enteritidis AISLADAS DESDE HUMANOS, GAVIOTAS Y AVES COMERCIALES

DETERMINATION OF SURVIVAL TO STRESS CONDITIONS OF *Salmonella enterica* serovar Enteritidis STRAINS ISOLATED FROM HUMANS, GULLS AND POULTRY

Marcela Fresno Ramírez

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Financiamiento: Proyecto ISID 9102.012.

RESUMEN

Las especies reactivas del O₂ y del N₂ son importantes mecanismos de defensa antimicrobianos. *Salmonella* necesita sobrevivir al daño oxidativo producido por estas defensas para poder establecer la infección. Debido a que previamente se ha observado variabilidad fenotípica entre cepas de *S. Enteritidis*, en este trabajo se estudió la resistencia a estrés oxidativo de 18 cepas de *S. Enteritidis* provenientes de distintos hospederos, comparándose la capacidad de supervivencia de estos grupos de bacterias frente al desafío con radicales libres derivados del O₂ y del N₂. Los resultados muestran diferencias significativas en la capacidad de supervivencia de las cepas de *S. Enteritidis*, pero no se detectaron diferencias significativas en la capacidad de supervivencia entre grupos y que existe baja correlación entre los ensayos. Finalmente, se sugiere la realización de nuevos estudios para complementar los resultados obtenidos.

Palabras claves: *S. Enteritidis*, supervivencia, estrés oxidativo.

ABSTRACT

Reactive oxygen and nitrogen species are important antimicrobial defense mechanisms. *Salmonella* needs to survive the oxidative damage produced by these species to establish the infection. As previous works have shown phenotypic variability among *S. Enteritidis* strains, we studied the survival ability of 18 strains of *S. Enteritidis* from different hosts by comparing their survival to the challenge to O₂ and N₂ free radicals. The results show significant differences between strains of *S. Enteritidis*, but no significant differences among groups and a low correlation between assays. Finally, we suggest that new studies are required to complement the results obtained in this work.

Key words: *S. Enteritidis*, survival, oxidative stress.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El género *Salmonella* corresponde a bacterias intracelulares facultativas (2), Gram negativas, de la familia Enterobacteriaceae (6). Actualmente se reconocen tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea* (22), con más de 2500 serovares (6).

Su principal sitio de infección es el tracto intestinal de humanos y animales homeotermos y poiquilotermos, y puede además, formar parte de la flora normal de reptiles y anfibios. Existen algunos serotipos especie-específicos, pero la mayoría tiene un amplio rango de hospederos (16). En conjunto, estos serotipos producen una gran variedad de infecciones, que van desde gastroenteritis autolimitantes hasta enfermedades sistémicas severas (1).

La bacteria se disemina a través de excreciones, aunque sin multiplicarse de forma significativa. Puede sobrevivir en el ambiente durante un tiempo variable (desde unas semanas hasta un par de meses), dependiendo de las condiciones de temperatura, humedad y pH. Por el contrario, es rápidamente destruida con la pasteurización y es sensible a desinfectantes comunes (5).

Las aves silvestres, se infectan con *Salmonella* debido a las características alimenticias de ellas, ya sea por ser rapaces, carroñeras o recogedoras de basura, tales como buitres, cuervos y gaviotas. Esto lleva a que la bacteria se localice en el intestino. Las aves son relativamente refractarias a la enfermedad, pudiendo actuar como portadores asintomáticos de la infección (23). En cuanto a las aves comerciales, *S. enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) produce infecciones intestinales asintomáticas, aunque también se describen brotes agudos de enfermedad clínica y altos niveles de mortalidad en pollos menores de dos semanas. Los huevos son infectados por la vía transovárica y por contaminación externa de la cáscara (6).

En el humano, *S. Enteritidis* coloniza el intestino delgado, provocando una gastroenteritis auto limitada (8). Esta enfermedad se asocia principalmente al consumo de huevos y productos derivados contaminados (6). Existen complicaciones más severas de la enfermedad, como bacteremia o meningitis, que pueden desarrollarse en ancianos, niños pequeños, mujeres embarazadas o personas inmunocomprometidas (17).

A lo largo de los años, *S. Enteritidis* ha superado a *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) como el serotipo aislado con mayor frecuencia en todo el mundo (13, 25), situación que se repite en Chile (8). En las aves comerciales, se puede deber a la intensificación

de las prácticas de manejo, reducción en la diversidad genética de los reproductores, erradicación de cepas de *Salmonella* competitivas y a la evolución en la virulencia del patógeno (20, 24).

Para los patógenos, las diferentes capacidades de respuesta a las diversas condiciones de estrés pueden determinar el desenlace clínico de un individuo infectado (12). Dentro del hospedero, *Salmonella* se expone a diversos mecanismos de defensa, incluyendo el daño oxidativo (11). Las células del hospedero poseen dos sistemas antimicrobianos importantes, que son las vías NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS, de su nombre en inglés) (7), que al ser inducidas generan los radicales superóxido (O_2^-) y óxido nítrico (NO) respectivamente. Estas moléculas pueden actuar directamente como especies reactivas contra *Salmonella*, pueden ser transformadas enzimáticamente en otras especies reactivas (H_2O_2 y NO_2) o reaccionar entre ellas para formar el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) (10).

Entre los puntos claves del establecimiento de la infección por *Salmonella*, está su habilidad para sobrevivir y proliferar dentro de las células fagocíticas, específicamente dentro de un compartimiento de membrana llamado vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV, de su nombre en inglés “*Salmonella* containing vacuole”) (1). Es por esto que la bacteria ha desarrollado una serie de defensas antioxidativas que pueden eliminar o reparar los daños producidos por las especies reactivas (10).

Salmonella expresa un arsenal de enzimas detoxificantes, que difieren en su localización celular y sustrato. El anión superóxido es débilmente reactivo y no puede traspasar la pared bacteriana, es por esto que es necesaria su transformación a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que difunde fácilmente a través de la membrana bacteriana (11). Se sabe de la existencia de dos superóxido dismutasas, localizadas en el periplasma y citoplasma bacteriano, que dismutan el superóxido a H_2O_2 y oxígeno molecular, considerándose la primera línea de defensa contra el anión superóxido (10). Estas especies reactivas del oxígeno pueden oxidar y dañar proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (11). Como segunda línea de defensa existen catalasas, peroxirredoxinas, nitrato y nitrito reductasas, las que se encuentran en el citoplasma y/o periplasma bacteriano (10, 11, 14). En la Tabla 1 se indican las enzimas bacterianas y sus respectivas reacciones.

Tabla 1: Principales enzimas bacterianas

ENZIMA	LOCALIZACIÓN	REACCIÓN
Superóxido dismutasas	Periplasma	$O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Catalasas	Citoplasma	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Peroxiirredoxinas	Citoplasma	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$
Nitrato reductasas	Periplasma y citoplasma	$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$
Nitrito reductasas	Periplasma y citoplasma	$NO_2^- \rightarrow NH_4^+$

Se ha postulado que la supervivencia de *S. Enteritidis* en albúmina de huevo es esencial para su transmisión hacia los humanos (9). Yim *et al.* determinaron que existen diferencias en la capacidad de supervivencia en albúmina de huevo entre las cepas de *S. Enteritidis* aisladas de fuentes humanas y no humanas, siendo las cepas de origen humano las más resistentes. También pudieron determinar que existen diferencias en la capacidad de invasión de estas cepas a células epiteliales intestinales humanas (25).

Considerando tales antecedentes, el objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad de supervivencia de cepas de *S. Enteritidis* aisladas desde distintos hospederos, incluyendo humanos, gaviotas y aves comerciales, frente al desafío con radicales libres del oxígeno y del nitrógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

i. Cepas bacterianas

Se utilizó un total de 18 cepas de *S. Enteritidis*, que actualmente se encuentran disponibles en el cepario de la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Las cepas se diferencian en tres grupos (Tabla 2):

- Seis cepas aisladas desde aves comerciales (pollos broiler), por parte del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).
- Seis cepas aisladas desde gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*), por parte del Dr. Daniel González, de la Universidad de Concepción.
- Seis cepas aisladas desde humanos, por parte del Instituto de Salud Pública (ISP).

Tabla 2: Identificación de cepas utilizadas

Origen	Especie	Identificación origen	Identificación Cepario Enf. Infecc.
SAG	Broilers	549	5
		1000	10
		1001	11
		1002	12
		1003	13
		1004	14
Universidad de Concepción	Gaviotas	31	15
		32	16
		33	17
		36	20
		37	21
		38	23
ISP	Humanos	3472-10	24
		3474-10	25
		3475-10	26
		3477-10	27
		3487-10	32
		3470-10	33

Para su crecimiento las cepas se inocularon en caldo Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0,5% y cloruro de sodio 0,5%), se incubaron a 37°C en agitación durante 18 h y se sembraron en superficie en placas Petri con agar LB (caldo LB más agar al 1,3%). Luego se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su utilización. Para la realización del ensayo, desde cada placa Petri se resuspendió una colonia en caldo LB estéril, que luego fue incubado a 37°C en agitación durante 18 a 24 h, hasta obtener un título de 4,5 a 6,5 x 10¹⁰ UFC/mL (fase estacionaria de crecimiento) (12).

ii. Ensayos de supervivencia a estrés oxidativo

El ensayo consta de dos experimentos, uno cuyo desafío es con nitrito de sodio (NaNO₂) para evaluar la supervivencia a radicales derivados del N₂ y otro con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para evaluar la supervivencia a radicales derivados del O₂. El ensayo se realizó según Lu *et al.* 2002 (12), con algunas modificaciones (18).

Ensayo de supervivencia a radicales del N₂

De las cepas crecidas en caldo LB se realizaron diluciones de 1:100 en caldo LB pH 5 (tampón citrato de sodio/ácido cítrico 0,1 M), y se agregó NaNO₂, a una concentración final de 10 mM. Luego el inóculo se incubó a 37°C durante 6 h. La supervivencia se evaluó con el recuento de UFC a los tiempos 0, 3 y 6 h, expresando los valores en porcentaje respecto del tiempo 0, que se consideró como el 100%. El recuento de UFC de cada cepa y en cada tiempo se realizó en triplicado.

Ensayo de supervivencia a radicales del O₂

De las cepas crecidas en caldo LB se realizaron diluciones de 1:100 en caldo LB, y se agregó H₂O₂ a una concentración final de 15 mM y se incubó a 37°C durante 30 min. La supervivencia se evaluó con el recuento de UFC a los tiempos 0 y 30 min expresando los valores en

porcentaje respecto del tiempo 0, que se consideró como el 100%. El recuento de UFC de cada cepa y en cada tiempo se realizó en triplicado.

iii. Análisis de resultados

El análisis de los datos se realizó de la misma forma para ambos ensayos de supervivencia. Para cada cepa se calculó su promedio de porcentaje de sobrevivencia en base a los recuentos en triplicado. Luego se obtuvieron los promedios de cada grupo de cepas (aves silvestres, aves comerciales y humanos), los valores se transformaron según el método arco seno (4) y se determinó la presencia de diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre cepas y entre grupos mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se calculó el coeficiente de correlación entre los dos ensayos y en el caso del nitrito de sodio, se realizó la comparación entre los diferentes tiempos. La interpretación de la correlación se realizó según las reglas de Colton (3).

RESULTADOS

I. Ensayo de supervivencia a NaNO₂

Los resultados de este ensayo se observan en la Tabla 3. No se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) en la capacidad de supervivencia de las cepas según su origen (Figura 1).

Tabla 3: Resultados del ensayo de supervivencia a NaNO₂ (10 mM) por cepa de S. Enteritidis aisladas de diferentes especies, indicando sus porcentajes (%) a las 3 y 6 h.

Especie	Cepa	3 h		6 h	
		%	DS	%	DS
B	5	19,59	2,05	0,76	0,04
	10	23,54	2,12	0,62	0,27
	11	27,46	2,54	0,07	0,00
	12	31,34	3,83	0,04	0,01
	13	28,51	2,31	0,17	0,02
	14	32,50	0,67	0,18	0,01
G	15	18,25	1,31	1,74	0,26
	16	25,60	2,14	1,27	0,04
	17	31,64	5,45	0,09	0,02
	20	20,63	1,80	0,05	0,02
	21	22,95	2,08	0,50	0,10
	23	27,03	1,51	1,23	0,26
H	24	20,98	0,92	0,12	0,01
	25	27,33	1,32	2,22	0,25
	26	21,81	0,98	1,86	0,14
	27	18,25	1,77	0,03	0,01
	32	22,58	3,03	1,91	0,05
	33	24,75	2,52	0,51	0,50

B: Broilers, G: Gaviotas, H: Humanos, DS: Desviación estándar.

Figura 1: Resultados del ensayo de supervivencia a NaNO₂ (10 mM) de cepas de S. Enteritidis, indicando sus porcentajes (%) a las 3 h de exposición. Cepas con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

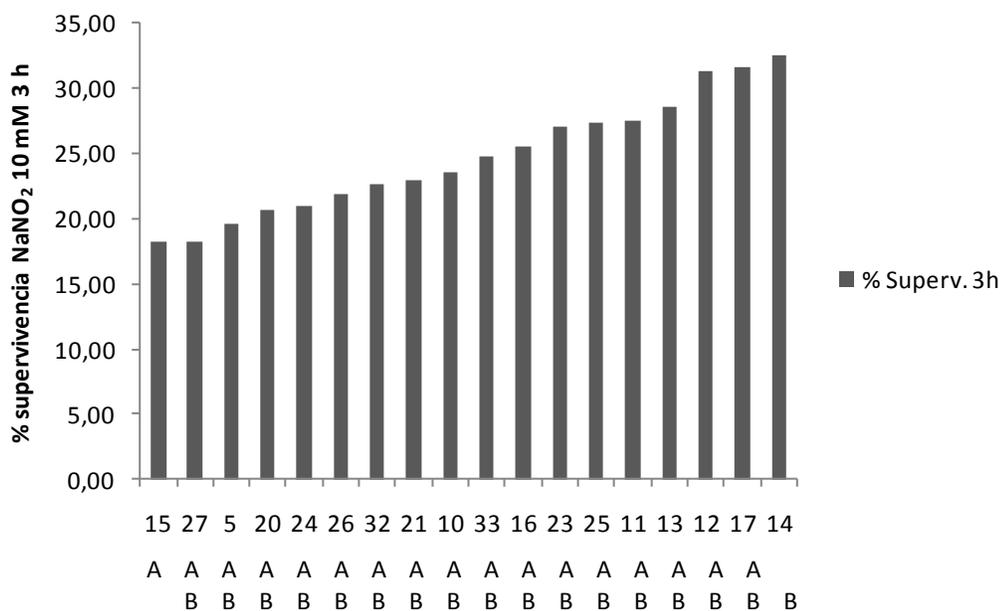


Figura 2: Resultados del ensayo de supervivencia a NaNO₂ (10 mM) de cepas de S. Enteritidis, indicando sus porcentajes (%) a las 6 h de exposición. Cepas con una letra común no son significativamente diferentes (p≤0,05).

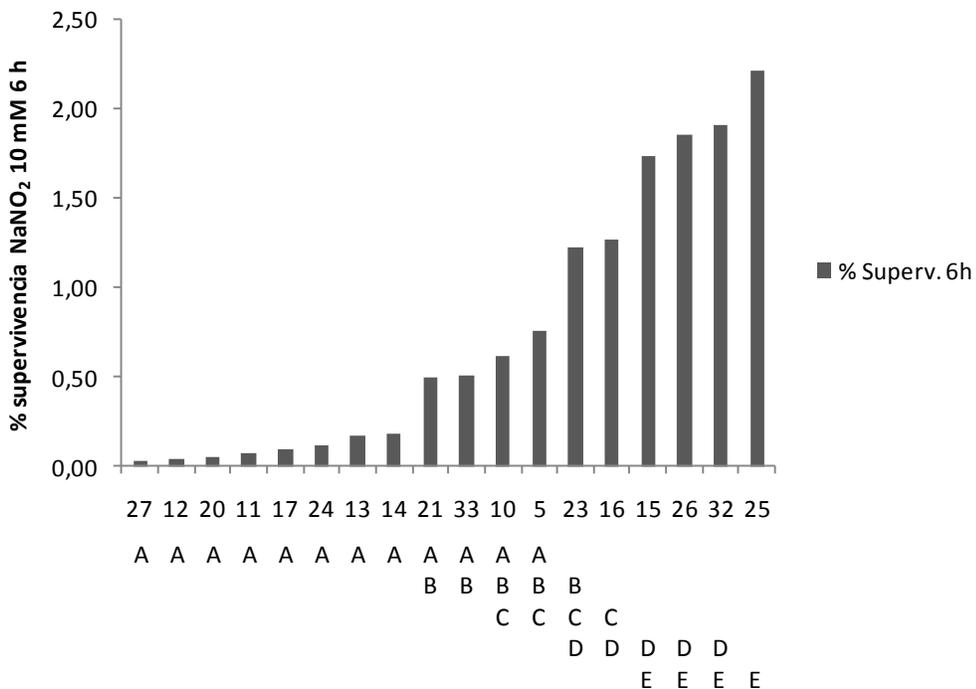
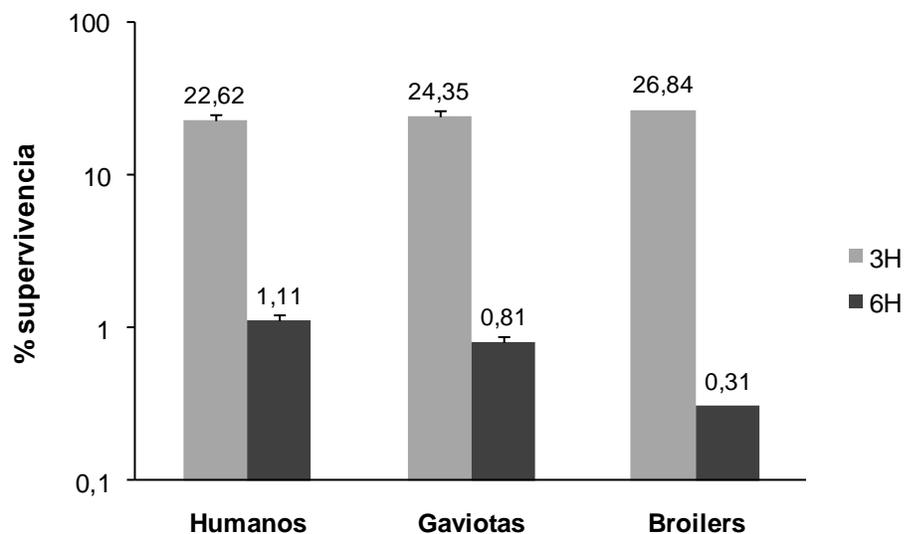


Figura 3: Resultados del ensayo de supervivencia a NaNO₂ (10 mM) de cepas de S. Enteritidis agrupadas según hospedero, indicando sus porcentajes (%) promedio a las 3 y 6 h de exposición.



II. Ensayo de supervivencia a H₂O₂

Los resultados de este ensayo con todas las cepas analizadas se observan en la Tabla 4. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad de supervivencia de las cepas según su origen (Figura 2).

Tabla 4: Resultados del ensayo de supervivencia a H₂O₂ (15 mM) por cepa de S. Enteritidis aisladas de diferentes especies, indicando sus porcentajes (%).

Especie	Cepa	% Superv.	DS
B	5	10,83	0,76
	10	8,08	3,35
	11	15,19	4,67
	12	7,98	0,33
	13	22,75	2,83
	14	21,76	1,67
G	15	28,33	2,53
	16	23,56	2,26
	17	9,09	2,39
	20	9,64	1,07

	21	16,96	2,17
	23	19,63	2,25
H	24	24,1	1,01
	25	10,83	2,65
	26	20,50	0,96
	27	5,68	1,07
	32	10,21	1,90
	33	12,38	2,51

B: Broilers, G: Gaviotas, H: Humanos, DS: Desviación estándar.

Figura 4: Resultados del ensayo de supervivencia a H₂O₂ (15 mM) de cepas de S. Enteritidis, indicando sus porcentajes (%) a los 30 min de exposición. Cepas con una letra común no son significativamente diferentes (p<0,05).

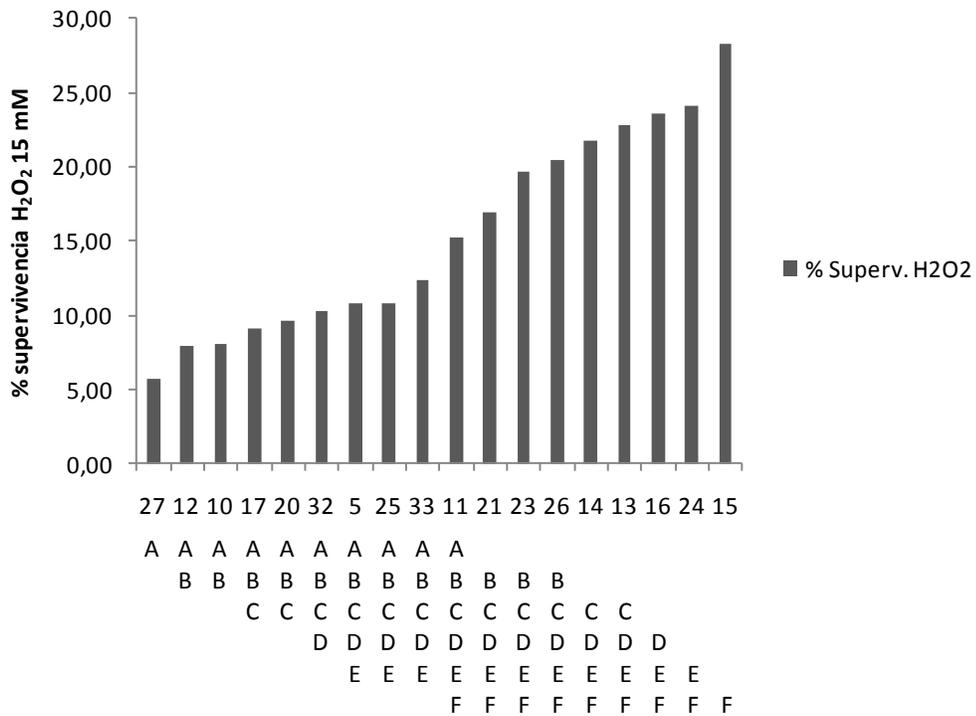


Figura 5: Resultados del ensayo de supervivencia a H₂O₂ (15 mM) de cepas de S. Enteritidis agrupadas según hospedero, indicando sus porcentajes (%) promedio a los 30 min de exposición.

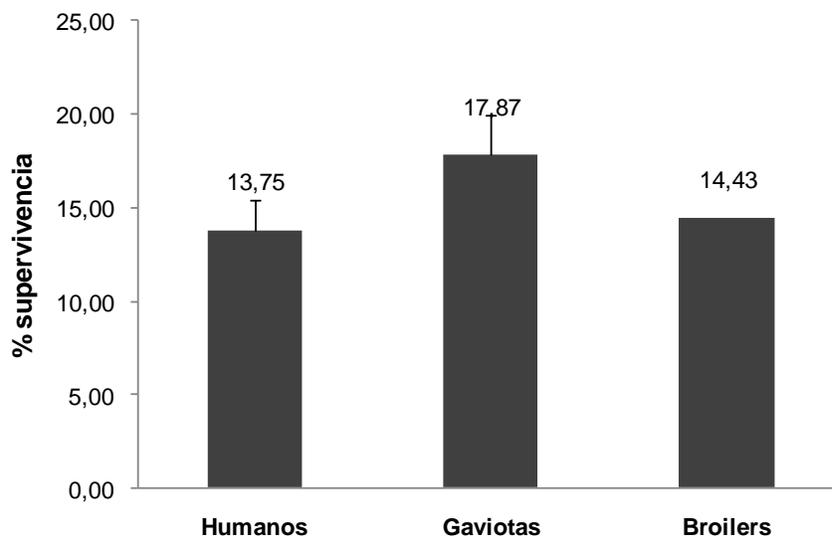


Tabla 5: Cálculos de coeficiente de correlación de cepas de S. Enteritidis entre ensayos de supervivencia a condiciones de estrés.

Comparación	Correlación	Interpretación
H ₂ O ₂ - NaNO ₂ 3h	0,02	Sin correlación
H ₂ O ₂ - NaNO ₂ 6h	0,3	Baja correlación
NaNO ₂ 3h - NaNO ₂ 6h	-0,24	Baja correlación y de carácter inverso

DISCUSIÓN

Existe evidencia de una importante variación en la virulencia de diferentes cepas de *S. Enteritidis* (20), pudiendo haber cepas de alta virulencia que difieren fenotípicamente de las de baja virulencia (21). En reportes previos, se ha visto que existen subpoblaciones entre cepas de *S. Enteritidis*, con diferente capacidad de atacar e invadir células de la granulosa ovárica aviar (20, 25). Se ha comprobado que hay diferencias en la capacidad de supervivencia en albúmina de huevo e invasión a células epiteliales intestinales humanas, entre cepas de fuentes humanas y no humanas, además de cepas aisladas desde pacientes humanos con enfermedad gastrointestinal y enfermedad sistémica (25).

En el genoma de las bacterias se seleccionan mutaciones que mejoran la adaptación del patógeno a factores estresantes ambientales. Aunque también se describen mutaciones que no tienen consecuencias o son deletéreas (9). Robbe-Saule *et al.* demostraron que existen mutantes de *S. Enteritidis* que varían en su supervivencia a H_2O_2 . Esto podría deberse a una competencia entre los factores sigma σ^S y σ^{70} por la RNA polimerasa, especialmente cuando las bacterias se encuentran en fases de crecimiento y son enfrentadas a situaciones de estrés (19). En este estudio sí se encontraron diferencias significativas en la capacidad de supervivencia de las diferentes cepas de *S. Enteritidis*, tanto para el ensayo de H_2O_2 (Figura 4) como para el de $NaNO_2$ (Figuras 1 y 2), lo que concuerda con lo planteado por otros autores.

Se sabe que *S. Enteritidis* está adaptada a una gran variedad de ambientes, como por ejemplo ratones, aves comerciales, huevos y humanos, entre otros. En el caso del huevo, se han encontrado variantes más adaptadas para crecer y sobrevivir en ellos, lo que las ayudaría a infectar al hospedero humano (9). Todo esto indica que es posible que existan diferencias en la capacidad de supervivencia a condiciones de estrés entre cepas de *S. Enteritidis* de diferente origen. Sin embargo, en este estudio no pudo determinarse la presencia de diferencias significativas entre los grupos de cepas en los ensayos de supervivencia a estrés oxidativo (Figuras 3 y 5). Debido a que existen diferencias entre cepas de *S. Enteritidis*, la falta de diferencias entre grupos de hospederos puede deberse al bajo número de aislados evaluados, por lo que se debería continuar estos estudios incorporando un mayor número de muestras, de manera de generar conclusiones con mayor seguridad.

También es factible que verdaderamente no existan variaciones significativas en las capacidades de resistencia al estrés oxidativo, siendo una característica muy conservada y necesaria para la supervivencia de *Salmonella*, manteniéndose constante entre los diferentes hospederos de esta bacteria.

En etapas tempranas de la infección bacteriana, las especies reactivas del oxígeno son las encargadas de controlar a *Salmonella*, mientras que en etapas tardías lo hacen las especies reactivas del nitrógeno (15). Esto puede explicar la inexistencia de correlación entre los ensayos de supervivencia a H_2O_2 y $NaNO_2$ 3h (Tabla 5), situación que estaría reflejando los diferentes momentos en que se expresan los mecanismos de supervivencia para radicales derivados del O_2 o del N_2 .

Al comparar los ensayos de H_2O_2 y $NaNO_2$ 6h, la correlación es mayor (Tabla 5), lo que sugiere la actuación conjunta de sistemas de reparación del daño oxidativo activados independientemente de la causa.

No existe una explicación clara respecto de la correlación inversa entre los ensayos de $NaNO_2$ a las 3 y 6 h (Tabla 5). Como hipótesis se puede plantear la existencia de diferentes mecanismos de defensa a esos radicales y que son expresados a diferentes tiempos, lo que genera variaciones drásticas en la supervivencia de las cepas a los tiempos evaluados. Se requieren nuevos estudios para dilucidar las causas subyacentes de este hallazgo.

CONCLUSIONES

1. Existen diferencias significativas en las capacidades de supervivencia de las cepas de *S. Enteritidis* a condiciones de estrés oxidativo.
2. No existen diferencias significativas entre las capacidades de supervivencia de las cepas de *S. Enteritidis* agrupadas según hospedero, frente al desafío con radicales derivados del O_2 y del N_2 , requiriéndose nuevos estudios para esclarecer los resultados obtenidos.
3. Las correlaciones variables encontradas sugieren la existencia de mecanismos específicos y comunes de resistencia a $NaNO_2$ y H_2O_2 por parte de las cepas de *S. Enteritidis* aisladas de diferentes especies, en las condiciones experimentales de este trabajo.

REFERENCIAS

1. **Aussel, L., W. Zhao, M. Hebrard, A. A. Guilhon, J. P. Viala, S. Henri, L. Chasson, J. P. Gorvel, F. Barras, and S. Meresse.** 2011. Salmonella detoxifying enzymes are sufficient to cope with the host oxidative burst. *Mol Microbiol* **80**:628-640.
2. **Babu, U., P. Wiesenfeld, D. Gaines, and R. B. Raybourne.** 2009. Effect of long chain fatty acids on Salmonella killing, superoxide and nitric oxide production by chicken macrophages. *Int J Food Microbiol* **132**:67-72.
3. **Dawson-Saunders, B., and R. Trapp.** 1997. Compilación de datos en investigación médica., In: *Bioestadística médica*, 2nd ed, Mexico DF, Mexico., p. 49-75.
4. **Dawson-Saunders, B., and R. Trapp.** 1997. Estimación y comparación de medias., In: *Bioestadística médica*, 2nd ed, Mexico DF, Mexico., p. 119-147.
5. **Del Luján, M., and G. Blas.** 2007. Salmonella, In: *Microbiología Veterinaria*, Buenos Aires, Argentina., p. 210-214.
6. **Dunkley, K. D., T. R. Callaway, V. I. Chalova, J. L. McReynolds, M. E. Hume, C. S. Dunkley, L. F. Kubena, D. J. Nisbet, and S. C. Ricke.** 2009. Foodborne Salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe* **15**:26-35.
7. **Fang, F. C.** 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**:820-832.
8. **Fica, A., M. Alexandre, S. Prat, A. Fernandez, J. Fernandez, and I. Heitmann.** 2001. Changes in epidemiological patterns of salmonellosis in Chile. Since *Salmonella typhi* to *Salmonella enteritidis*. *Rev Chil Infectol* **18**:85-93.
9. **Guard-Petter, J.** 2001. The chicken, the egg and Salmonella enteritidis. *Environ Microbiol* **3**:421-430.
10. **Hebrard, M., J. P. Viala, S. Meresse, F. Barras, and L. Aussel.** 2009. Redundant hydrogen peroxide scavengers contribute to Salmonella virulence and oxidative stress resistance. *J Bacteriol* **191**:4605-4614.
11. **Horst, S. A., T. Jaeger, L. A. Denkel, S. F. Rouf, M. Rhen, and F. C. Bange.** 2010. Thiol peroxidase protects Salmonella enterica from hydrogen peroxide stress in vitro and facilitates intracellular growth. *J Bacteriol* **192**:2929-2932.
12. **Lu, S., P. B. Killoran, F. C. Fang, and L. W. Riley.** 2002. The global regulator ArcA controls resistance to reactive nitrogen and oxygen intermediates in Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Infect Immun* **70**:451-461.
13. **Lu, S., A. R. Manges, Y. Xu, F. C. Fang, and L. W. Riley.** 1999. Analysis of virulence of clinical isolates of Salmonella enteritidis in vivo and in vitro. *Infect Immun* **67**:5651-5657.

14. **Lundberg, J. O., E. Weitzberg, J. A. Cole, and N. Benjamin.** 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol* **2**:593-602.
15. **Mastroeni, P., and M. Sheppard.** 2004. Salmonella infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. *Microbes Infect* **6**:398-405.
16. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-856.
17. **Patrick, M. E., P. M. Adcock, T. M. Gomez, S. F. Altekruse, B. H. Holland, R. V. Tauxe, and D. L. Swerdlow.** 2004. Salmonella enteritidis infections, United States, 1985-1999. *Emerg Infect Dis* **10**:1-7.
18. **Retamal, P., M. Castillo-Ruiz, N. Villagra, J. Morgado, and G. Mora.** 2010. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing *S. Typhimurium* SPI-3 Sequences. *PLoS ONE* **5**:e9394.
19. **Robbe-Saule, V., G. Algorta, I. Rouilhac, and F. Norel.** 2003. Characterization of the RpoS status of clinical isolates of *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol* **69**:4352-4358.
20. **Saeed, A. M., S. T. Walk, M. Arshad, and T. S. Whittam.** 2006. Clonal structure and variation in virulence of *Salmonella enteritidis* isolated from mice, chickens, and humans. *J AOAC Int* **89**:504-511.
21. **Solano, C., B. Sesma, M. Alvarez, T. J. Humphrey, C. J. Thorns, and C. Gamazo.** 1998. Discrimination of strains of *Salmonella enteritidis* with differing levels of virulence by an in vitro glass adherence test. *J Clin Microbiol* **36**:674-678.
22. **Su, L. H., and C. H. Chiu.** 2007. Salmonella: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J* **30**:210-219.
23. **Tizard, I.** 2004. Salmonellosis in Wild Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* **13**:50-66.
24. **Wray, C., and A. Wray.** 2000. Environmental aspects of *Salmonella*, In: *Salmonella in Domestic Animals*, King's Lynn, UK., p. 265-283.
25. **Yim, L., L. Betancor, A. Martinez, G. Giossa, C. Bryant, D. Maskell, and J. A. Chabalgoity.** 2010. Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from humans or animals. *Appl Environ Microbiol* **76**:6812-6820.