

Estudio de excreción de la cepa vacunal de *Salmonella* Enteritidis en recría de ponedoras hasta las 16 semanas de vida comparando dos técnicas de detección: PCR y método ISO.

V. CORTÉS^{1*}, S. SEVILLA-NAVARRO¹, C. GARCÍA¹, A. TUDÓN¹, S. BARRABÉS²
E. MONTERO³, L. MONTORO³, E. GARCÍA³, S. VEGA³, D. PEÑARANDA⁴, F. MARCO⁴,
P. CATALÁ-GREGORI¹, y C. MARÍN³

¹Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV), Castellón, ²IDT Biologika Animal Health, Barcelona, ³Universidad Cardenal Herrera-CEU, Valencia, Spain, ⁴Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.

*Corresponding autor: v.cortes@cecav.es

Salmonella spp., es uno de los patógenos zoonóticos de mayor importancia en salud pública. Los últimos datos publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) muestran un total de 94.625 casos de salmonelosis en Europa en 2015. Con la finalidad de disminuir su prevalencia, en 2007 se iniciaron los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PNCS) para alcanzar los niveles establecidos por la Unión Europea (UE). Para ello se aplican diferentes medidas de profilaxis, como la vacunación. Según regula la UE, las vacunas frente a *S. Enteritidis* deben aplicarse en ponedoras durante el período de recría, convirtiéndose en la medida más extendida y útil para controlar la bacteria en el sector avícola.

En la actualidad, la identificación de la bacteria se realiza mediante métodos de cultivo tradicionales basados en la norma ISO 6579: 2002 (anexo D). Esta metodología resulta lenta, y laboriosa ya que requiere 5 días para el aislar y caracterizar el microorganismo. Por ello, están aumentando el número de técnicas alternativas, como las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas permiten la detección y cuantificación molecular de la bacteria, siendo capaces de diferenciar entre cepas campo y vacunales, con una prueba simple, rápida y económica.

El objetivo del estudio fue evaluar la excreción en heces de la cepa Salmovac 440® y su diseminación en el ambiente comparando ambas técnicas ISO 6579: 2002 (anexo D) y PCR (Kylt® SE DIVA 1, AniCon, Alemania). Durante el estudio, se vacunaron con 3 dosis de Salmovac 440® un total de 120 pollitas, y se muestrearon individualmente a intervalos semanales hasta el final del período de recría. Los resultados mostraron que el 98% de las aves excretaban por heces la cepa vacunal 48 horas tras la vacunación. La vacuna fue detectada durante más tiempo en las muestras obtenidas mediante calzas directamente de la cama que de hisopos individuales. De acuerdo con las técnicas diagnósticas utilizadas, no se encontraron diferencias estadísticas entre ambos métodos (ISO vs PCR). Estos resultados muestran que el método de PCR puede ser empleado del mismo modo que el método ISO, permitiendo obtener resultados en menor tiempo.

Palabras Clave: *Salmonella*; Vacunación; Cepa Vacunal; ISO; PCR

Salmonella spp. is one of the most important zoonotic pathogen with economic impact in public health. The results reported by the European Food Safety Authority indicate that *Salmonella* is responsible for 94.625 human cases of salmonellosis in Europe. Due to the important public health concern, in 2007 the National *Salmonella* Control Programs were implemented with the aim of reducing *Salmonella* prevalence at farm level, in order to achieve the levels defined by the European Union. Different biosecurity and prophylactic measures have been implemented, like

vaccination. The EU regulations implemented the vaccination of laying hens during the rearing period against *S. Enteritidis* being one of the most important control measures in poultry farms. Nowadays, the ISO method 6579:2002 (annex D) is the standard method for the detection of *Salmonella* spp. However, more than five days are needed to isolate and characterize a positive sample. For this reason, modern techniques based on Polymerase Chain Reaction (PCR) Method are raising at laboratory level for *Salmonella* diagnosis. These techniques are able to differentiate between both strains (field vs vaccine) with a simple, fast and economic test.

In this context, the aim of this study was to assess the shedding of the Salmovac 440® strain in faeces, its spreading through the house environment and to compare the strain detection by ISO and PCR technique.

During this study, a total of 120 pullets were vaccinated with Salmovac 440® at three timepoints, and were individually sampled at weekly intervals from the first day until the end of the rearing period. During the study, a total of 1260 cloacal swabs and 68 sock swabs were collected.

Results showed that 98% of the individuals were shedding the vaccine strain in faeces 48 hours after vaccination. Otherwise, the vaccine was detected from faeces collected directly from the litter with sock swabs for a longer period than the individuals. According with the diagnostic techniques used, no statistical significant difference was found between both methods (ISO vs PCR). These results showed that PCR methods are as useful as cultural methods currently part of the ISO method, obtaining results in less time.

Keywords: *Salmonella*; Vaccination; Vaccine strain; ISO; PCR

Introducción

Salmonella spp. es uno de los patógenos zoonóticos con mayor importancia en salud pública (EFSA, 2016). Los últimos datos revelados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) muestran que *Salmonella* es la responsable de 94.625 brotes en la Unión Europea durante 2015 (Figura 1), siendo *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) y *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) los serotipos con mayor prevalencia (EFSA, 2016)

La principal vía de contagio en humanos es debida al consumo de carne de pollo poco cocinada o a través de otros alimentos contaminados durante la preparación con carne cruda de pollo (EFSA, 2016). El consumo de carne de pollo ha aumentado en los últimos años debido a su perfil nutricional, su versatilidad y bajo precio. Por ello, controlar la calidad microbiológica de la carne de ave se ha convertido en una preocupación para la industria alimentaria.

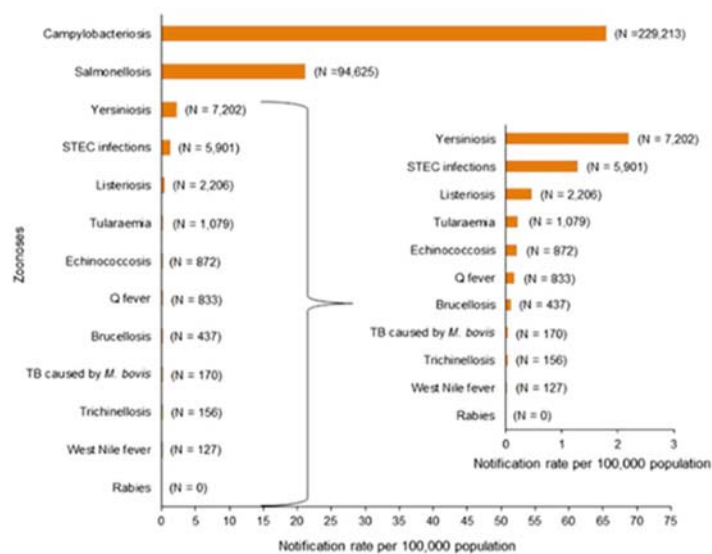


Figura. 1. Casos notificados por 100.000 personas (EFSA, 2016).

Debido al impacto de *Salmonella* en la salud pública, en 2007 se implementaron los Programas Nacionales de Control de *Salmonella* (PCNS) con el objetivo de reducir la prevalencia de la bacteria. En un estudio previo realizado por la EFSA (2007), se analizaron un total de 5.317 lotes de gallinas ponedoras a las 51 semanas de edad, en el que se halló un amplio rango de prevalencia (entre el 9 y el 79%), siendo el valor de España del 73,3%. En consecuencia, la Unión Europea determinó que debía reducirse la prevalencia de *Salmonella* spp. en gallinas ponedoras, siendo el objetivo establecido inferior o igual a un 2%, teniendo en cuenta *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

En la actualidad, el método ISO 6579:2002 (Anexo D) es el método estándar establecido para la detección de *Salmonella* spp. en muestras procedentes de producción primaria en avicultura (heces y muestras ambientales). Este método, basado en el cultivo de los microorganismos, permite el aislamiento y diferenciación de las cepas de *Salmonella* spp., siendo necesarios hasta 5 días para la confirmación y caracterización de una muestra positiva. Por esta razón, se han implementado nuevas técnicas de biología molecular para su diagnóstico, basadas en la amplificación del DNA de *Salmonella* spp. mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas técnicas presentan mejoras frente a los métodos clásicos, permitiendo detectar y diferenciar cepas campo de cepas vacunales de *Salmonella* spp. con un test rápido (24 horas), simple y económico.

Con el fin de alcanzar los niveles dictados por la Unión Europea, se han adoptado diferentes medidas de bioseguridad y profilaxis, entre las que encontramos el uso de vacunas. La vacunación de las gallinas ponedoras en España es obligatoria durante el periodo de recría, convirtiéndola junto a la limpieza y desinfección, en una de las medidas de control más importantes a nivel de granja en avicultura. Existen varias vacunas inactivadas autorizadas frente *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium*, siendo la última en el mercado Salmovac 440® (IDT Biologika GmbH) desde mayo de 2016.

Salmovac 440® es una vacuna viva atenuada que pretende proporcionar inmunidad activa contra frente *S. Enteritidis* y/o *S. Typhimurium*, reduciendo la colonización, prevalencia e invasión de la bacteria en el tracto gastrointestinal de los animales.

El objetivo del estudio fue evaluar la excreción vía fecal de la cepa Salmovac 440® y su diseminación en el ambiente comparando ambas técnicas ISO 6579: 2002 (anexo D) y PCR (Kylt® SE DIVA 1, AniCon, Alemania) en gallinas ponedoras durante el periodo de recría.

Material y Métodos

Los animales utilizados en este estudio fueron 120 pollitas marrones de 1 día de vida procedentes de una incubadora comercial, y fueron criadas en la granja de Investigación y Desarrollo de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (Náquera, Valencia) durante el periodo de recría (4 meses). Todas las muestras tomadas durante el estudio fueron analizadas en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV) en colaboración con la Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Este estudio se realizó durante el periodo comprendido entre septiembre de 2016 y enero de 2017.

Primer día de cría: Se tomaron dos muestras de agua (500 mL cada una), una del taque y otra procedente de las líneas de bebederos (Figura 2). Las muestras de agua se homogeneizaron en el laboratorio y se analizaron 25 mL de cada fuente. Para determinar el estado de *Salmonella* de los pollitos de un día, de conformidad con el Reglamento de la Comisión (CE 2003), se obtuvieron meconios de todos los polluelos (Figura 2) a la vez que se recolectaron fondos de caja, colocando todas las muestras obtenidas en bolsas estériles. Después del muestreo, los 120 animales fueron pesados individualmente y separados en dos corralinas de 60 animales cada uno.

Los animales fueron vacunados en el agua de bebida a día 2 de vida (24 horas después de la llegada a la explotación), a los 36 y 71 días de vida. La vacuna se reconstituyó de acuerdo con el protocolo indicado por la vacuna Salmovac 440®. También se recolectaron 10 mL de la vacuna reconstituida para saber que la dosis de vacuna que recibían los animales era la indicada por la casa comercial.

A su vez, se tomaron hisopos individuales de la cloaca de cada animal 24 horas tras la vacunación (día 3 de vida) y al final del periodo de cría para evaluar la diseminación individual de la vacuna. Además, 15 animales de cada corral fueron muestreados de forma individual mediante hisopos cloacales

y aleatoriamente dos veces a la semana (martes y viernes). Simultáneamente al muestreo individual, se tomaron muestras de dos pares de calzas de cada corral (Sterile cloth neutralizer, Terrasa, Spain) (Figura 2).

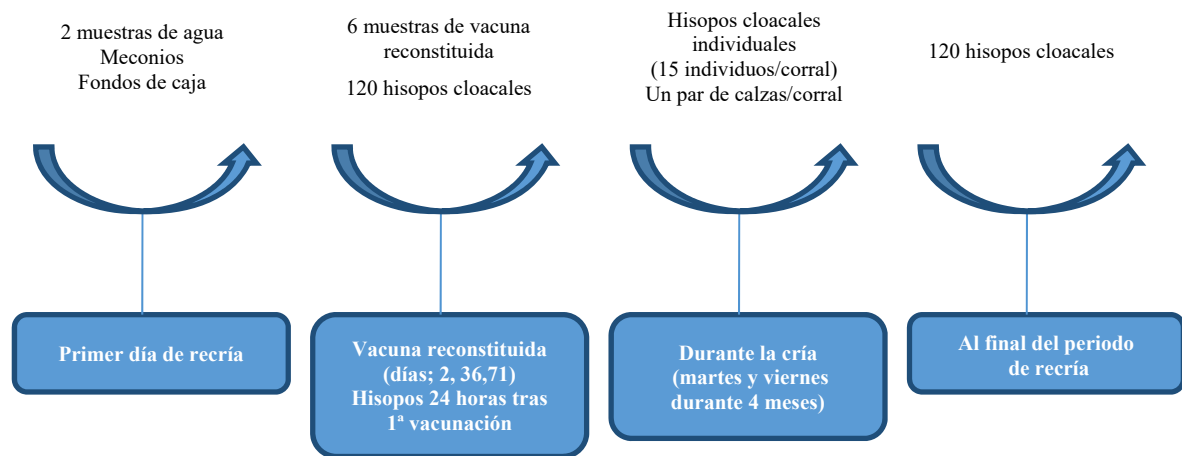


Figura. 2. Muestras recolectadas durante el estudio.



Figura. 3. Pollitas de un día de vida separadas en dos corrales de 60 animales cada una. (a) Corral A. (b) Corral B.

Durante el transcurso del estudio, el manejo de las gallinas ponedoras se realizó de acuerdo con las directrices para la experimentación de los animales (BOE, 2013).

Detección de *Salmonella* spp. mediante método microbiológico de cultivo

Las muestras de calzas, vacuna reconstituida en agua, agua de bebida (previa a la vacunación), meconios y fondos de caja fueron analizados mediante el método ISO 6579:2002 (Anexo D). En primer lugar, las muestras se preenriquecieron 1:10 vol/vol en agua de peptona tamponada 2,5% (BPW, Oxoid, Madrid, Spain) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Después de la incubación, las muestras preincubadas fueron transferidas a placas de agar Rappaport Vassiliadis modificado semisólido (MSRV, bioMérieux, Barcelona, Spain), e incubadas a $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas. Las colonias obtenidas en MSRV fueron sembradas en Xylosa–Lysina–Desoxycholato (XLD, Oxoid, Madrid, Spain) y en placas de AES *Salmonella* Agar Plate (ASAP, bioMérieux, Barcelona, Spain), e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Después de la incubación, 5 colonias típicas fueron sembradas mediante la técnica de siembra en masa en superficie a placas de Agar nutritivo sólido y semisólido (Biokar®, France) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 horas para realizar la confirmación bioquímica y el serotipado. A su vez, se realizó un test bioquímico mediante galerías API (API-20®, bioMérieux, Barcelona, Spain) para la confirmación de *Salmonella* spp. Todas las cepas aisladas fueron serotipadas siguiendo el esquema de Kauffman-White-Le Minor.

Detección y diferenciación de *Salmonella* spp. mediante el método basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras de hisopos cloacales individuales y las muestras de dos pares de calzas se analizaron mediante dos kits diferentes de PCR.

El screening cualitativo inicial para detectar la presencia de DNA de *Salmonella* spp. en las muestras recogidas se realizó mediante el test Kylt® *Salmonella* spp. (AniCon, Germany), usando el equipo 7300 de Applied Biosystems. Este kit está basado en un sistema duplex de Real-Time PCR. Las sondas específicas para la detección de *Salmonella* spp. y los controles de amplificación internos se encuentran marcados con los fluoróforos FAM y HEX respectivamente.

Una vez detectadas las muestras positivas, la diferenciación cualitativa entre la cepa de vacuna viva de *S. Enteritidis* (Salmovac 440®, IDT) y cepas de campo de dicho serotipo (SEf), se realizaron mediante el kit Kylt® SE DIVA 1 (AniCon, Germany) utilizando el equipo 7500 de Applied Biosystems. Este kit comercial está basado en un método de PCR a tiempo real múltiplex. Los genes específicos para el serotipo de *S. Enteritidis*, SEf y cepa vacunal (Salmovac 440®, IDT), se encuentran marcados con los fluoróforos FAM, Texas Red y Cy5, respectivamente.

Todas las muestras de calzas e hisopos cloacales fueron pre-enriquecidos 1:10 en Agua de peptona tamponada 2.5% (BPW, Oxoid, Madrid, Spain) e incubadas a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. 1 mL del sobrenadante de las muestras pre-enriquecidas fue transferido en un eppendorf y centrifugado durante 5 min a 10.000 rpm. Tras el centrifugado, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet obtenido con 200 μL del DNA Extraction-Mix e incubado entre 10 y 15 min a $100\pm 3^\circ\text{C}$. Las muestras incubadas fueron vortexadas y centrifugadas durante 5 min a 10.000 rpm. El sobrenadante obtenido fue el DNA extraído usado para ambas PCR.

Ambos protocolos de PCR incluyen un paso inicial de 95°C durante 1 min, seguido de 42 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y alineamiento y extensión a 60°C durante 1 min. El volumen final total para cada reacción de PCR fue de 20 μL , formado por la Mix de Reacción (Kylt® *Salmonella* spp. and Kylt® SE DIVA 1, AniCon, Germany) (18 μL) y el DNA extraído (2 μL).

Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante prueba de contrastes no paramétricos y se estableció que había diferencias significativas cuando la *p value* fue $< 0,05$ para un nivel de confianza del 95% (Statgraphics Centurion versión 16.2.04).

Resultados y Discusión

No se observaron efectos adversos en los animales durante el uso de la vacuna Salmovac 440® ni durante el periodo de experimentación. Durante el transcurso del estudio hubo 24 bajas por causas ajenas a la administración de la vacuna.

Durante este estudio, se recolectaron un total de 1.256 muestras; 2 muestras de agua antes de la primera vacunación; 6 muestras de vacuna reconstituida en agua de bebida; 4 meconios/fondos de caja; 1.176 hisopos cloacales y 68 pares de calzas.

Las muestras de ambiente recogidas mediante 2 pares de calzas, agua, meconios, y fondos de caja a día 1 de vida previa vacunación, fueron negativas a *Salmonella* spp. de acuerdo con los resultados obtenidos. El día después de la entrada (2 días de vida), la vacuna fue administrada y el 98% (n=118) de los animales excretó la vacuna en heces a día 3 de vida.

En relación con las diferentes aplicaciones de la vacuna y los resultados individuales de hisopos cloacales obtenidos, podemos observar de forma global que el 98% de los individuos fueron positivos a la cepa de *S. Enteritidis* vacunal 24 horas después de la primera dosis (día 3 de vida), evidenciando que la mayor parte de los animales recibieron la vacuna. Así mismo, la cepa vacunal fue detectada en muestras de hisopo cloacal hasta el día 27 después de la primera vacunación, 7 días tras la segunda dosis y 12 días tras la tercera (Figura 4).

La media de los resultados obtenidos por PCR de las muestras recolectadas de forma individual semanalmente (corral A y corral B) tras la aplicación de la vacuna pueden verse en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de excreción individual de la vacuna en heces en relación con el momento de muestreo (martes/viernes)

Muestreo (semanas)	Nº muestras	Martes (%)	Viernes (%)	Media (%)
1	180	100	100	100
2	60	97	73	85
3	60	40	7	23
4	60	7	0	3
5	60	0	10 (2ª vacunación)	5
6	60	20	0	10
7	60	0	0	0
8	60	0	0	0
9	60	0	0	0
10	60	0	7(3ª vacunación)	3
11	60	3	3	3
12	60	0	0	0
13	60	0	0	0
14	60	3	0	0
15	60	0	0	0
16	60	0	0	0
17	96	0	0	0

%: porcentaje de muestras positivas.

Por otro lado, la vacuna fue detectada en las muestras que contenían heces recolectadas de la cama mediante calzas durante más tiempo que de los hisopos tomados directamente de la cloaca de los animales analizadas mediante la técnica de PCR. Tras la primera dosis, se pudo detectar la cepa de *S. Enteritidis* vacunal durante 32 días, otros 28 días tras la segunda (aunque de forma intermitente) y 14 días tras la tercera dosis.

La media de resultados obtenidos por PCR a partir de las muestras de calzas en cada corral se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de excreción de la vacuna detectada en calzas en relación con el momento de muestreo (martes/viernes).

Muestreo (semanas)	Nº muestras	Martes (%)	Viernes (%)	Media (%)
1	6	100	100	100
2	4	100	100	100
3	4	100	100	100
4	4	50	100	75
5	4	100	0 (2ª vacunación)	50
6	4	100	100	100
7	4	100	50	100
8	4	0	100	100
9	4	50	50	50
10	4	100	100 (3ª vacunación)	100
11	4	100	100	100
12	4	50	50	50
13	4	0	0	0
14	4	0	0	0
15	4	0	0	0
16	4	0	0	0
17	2	0	0	0

%: porcentaje de muestras positivas.

En relación a los resultados obtenidos en las muestras de calzas comparando los métodos de cultivo clásicos basados en el método ISO 6579:2002 (Anexo D) y los basados en PCR no fueron estadísticamente significativos ($p\text{-value} > 0,05$ para un nivel de confianza del 95% por la prueba de contrastes no paramétricos (Statgraphics Centurion), aunque el método ISO detectó con mayor frecuencia la cepa vacunal (Figura 4).

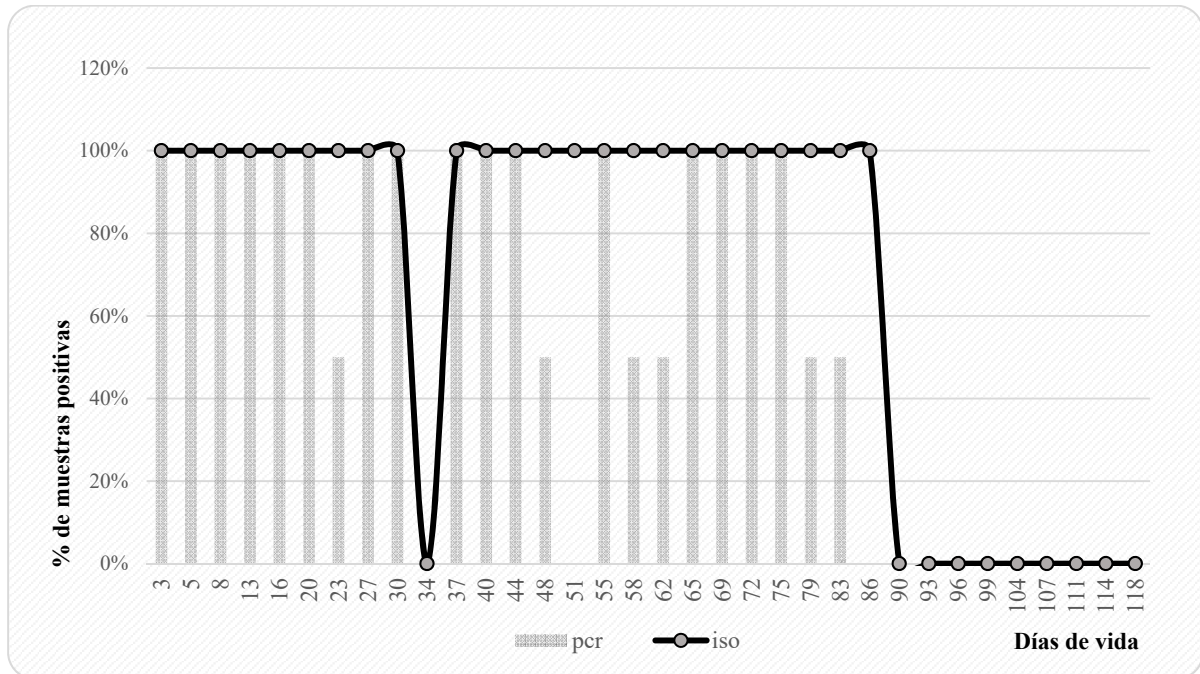


Figura 4. Detección de la cepa de *S. Enteritidis* vacunal en calzas por Método ISO y PCR.

Tanto los Programas Nacionales para el control del *Salmonella* spp. como el Reglamento (CE) 1177/2006 de la Comisión, contemplan el uso de vacunas en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus* durante el periodo de recria como una medida para la reducción de la excreción y la contaminación de los huevos (Programa Nacional de Control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de la especie *Gallus gallus*, 2017). Los datos obtenidos en este estudio nos sugieren que la cepa vacunal Salmovac 440® produce una correcta inmunización de los animales. La eliminación individual fue intermitente y la vacuna se detectó por más tiempo (32 días) que otras cepas que sólo fueron detectadas hasta los 23 días de vida (De Cort et al., 2015). La cepa vacunal se mantuvo viva en el ambiente hasta el día 90 de vida y fue detectada por ambos métodos analíticos. De esta manera, mantuvo protegidos de forma activa a los animales que no hubieran tomado la vacuna del agua debido a la transmisión horizontal demostrada en anteriores estudios (De Vylder et al., 2011).

Las diferencias de detección obtenidas (ISO vs. PCR), pueden deberse a que los límites de detección de ambas técnicas de ensayo difieren en un orden de magnitud, siendo para el método ISO de 9 ufc/muestra y para la PCR en torno a 100 ufc/muestra (Maurischat et al., 2015). Según indican los PNCS es posible utilizar métodos de análisis alternativos a la ISO 6579 si han sido validados frente a la norma EN/ISO 16140. En casos de muestras de producción primaria, una de las limitaciones encontradas en la detección de *Salmonella* por PCR, es la detección tanto de microorganismos muertos como vivos, siendo necesario el aislamiento posterior de las muestras positivas con el método ISO. Por este motivo el método de PCR sería una alternativa válida frente a los métodos de identificación microbiológica tradicionales como una técnica de screening y obtención de resultados negativos de forma rápida, permitiendo discriminar la cepa vacunal ante la presencia de *S. Enteritidis* en producción primaria, facilitando la toma de decisiones temprana.

Bibliografía

REAL DECRETO 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, **34**: 11370-11421.

DE CORT, W., HAESBROUCK, F., DUCATELLE, R. and VAN IMMERSEEL, F. (2015) Administration of a *Salmonella* Enteritidis Δ hilAssrAflIG strain by coarse spray to newly hatched broilers reduces colonization and shedding of a *Salmonella* Enteritidis challenge strain. *Poultry Science*; **94** (1): 131-135.

DE VYLDER, J., DEWULF, J., VAN HOOREBEKE, S., PASMANS, F., HAESBROUCK, F., DUCATELLE R. and VAN IMMERSEEL, F. (2011) Horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis in groups of experimentally infected laying hens housed in different housing systems. *Poultry Science*; **90**: 1391-1396.

European Food Safety Authority (EFSA). (2016) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2015. *EFSA Journal*; **14**, issue 12.

GANTOIS, I., DUCATELLE, R., TIMBERMONT, L., LOTTE-BOHEZ, F., HAESBROUCK, F., PASMANS, F. and IMMERSEEL F. (2006) Oral immunisation of laying hens with the live vaccine strains of TAD *Salmonella* vac® E and TAD *Salmonella* vac® T reduces internal egg contamination with *Salmonella* Enteritidis. *Vaccine* **24**: 6250-6255.

ISO 6579:2002 (Anexo D). (2002) «Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp.» International Organization for Standardization. Ginebra, Suiza.

MAURISCHAT S., SZABO I., BAUMANN, B. and MALORNY, B. (2015) Rapid real-time PCR methods to distinguish *Salmonella* Enteritidis wildtype field isolates from vaccine strains Salmovac SE/Gallivac SE and AviPro *SALMONELLA* VAC E. *Journal of Microbiological Methods* **112**: 92-98.

REGLAMENTO (CE) N.º 2160/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos transmitidos por los alimentos. *Diario Oficial de la Unión Europea* L **325**/1-15.

REGLAMENTO (UE) N.º 1177/2006 de la Comisión, de 1 de agosto de 2006 por el que se aplica el Reglamento (CE) no 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los requisitos de uso de métodos específicos de control en el marco de los programas nacionales de control de la salmonela en las aves de corral. *Diario Oficial de la Unión Europea* L **212**/3-5.

REGLAMENTO (UE) N.º 200/2012 DE LA COMISIÓN de 8 de marzo de 2012 relativo a un objetivo de la Unión de reducción de la *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* en las manadas de pollos de engorde, de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento (CE) n° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* L **71**/31-36.