

# ***Salmonella* spp. en hisopos cloacales, heces y huevos de gallinas ponedoras: estudio preliminar**

**C. GARCÍA<sup>1</sup>, P. CATALÁ-GREGORIO<sup>1\*</sup>, J.M. SORIANO<sup>2</sup>, A. L. TUDÓN<sup>1</sup>, V. BENÍTEZ<sup>3</sup>,  
L. ANDREU<sup>1</sup> e I. GRANERO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana CECAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón)

<sup>2</sup> Área de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Burjasot (Valencia)

<sup>3</sup> Asociación Avícola Valenciana ASAV, Alquerías del Niño Perdido (Castellón)

\*[direccion@cecav.es](mailto:direccion@cecav.es)

---

## **RESUMEN**

En este trabajo se estudió cualitativamente la contaminación de *Salmonella* spp. en muestras de heces, hisopos cloacales y huevos (interior y exterior) de una explotación de gallinas ponedoras, previa al sacrificio por ser positiva a *Salmonella* serotipo Enteritidis en autocontroles de heces y en controles oficiales. Para ello se seleccionaron 50 jaulas de las que se tomó: una muestra de heces de más de 150 gramos, tres muestras individuales de hisopos cloacales y una muestra de 6 huevos. En el caso de los huevos, se analizó el interior y el exterior de forma independiente. El método de aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. fue según la norma ISO 6579:2002 y su modificación (anexo D). Entre las cepas aisladas, se seleccionaron algunas características para posterior serotipado siguiendo el método de Kauffman White y caracterización genética mediante macrorrestricción genómica utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE).

Se obtuvo un 92.0% de positividad a *Salmonella* spp. en heces, sin embargo, de los 150 hisopos cloacales analizados, sólo el 1.3% resultó positivo. El 34.0% de las muestras de huevos analizadas exteriormente un día después de la fecha de puesta fueron positivas a *Salmonella* spp., pero ninguna muestra del interior del huevo fue positiva. El serotipo determinado en heces, hisopos y huevos exterior fue *Enteritidis*, en todos los casos.

La detección cualitativa del patógeno a altos niveles (92%) en las heces de gallina ponedora no implicó la presencia del mismo en el interior del huevo. De estos resultados se desprende la necesidad de evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella* spp. en las heces para poder establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el interior del huevo.

---

**Palabras clave:** Gallina ponedora; heces; hisopo; huevo; *Salmonella*

## ***Salmonella* spp. in faecal samples, cloacal swabs and hen eggs: preliminary study**

---

### **SUMMARY**

*The objective of this paper was to evaluate qualitatively the contamination of Salmonella spp. in faecal samples, cloacal swabs and eggs (egg shells and egg contents) in a laying hen farm with Salmonella serotype Enteritidis positive result during the monitoring and official samples, prior to the slaughter of the animals. Fifty random cages were selected and the following was collected from each one: a faecal sample of more than 150 grams, three individual samples of cloacal swabs and one sample of 6 eggs.*

Egg shells and egg contents were analyzed independently. *Salmonella* spp. isolation and identification was done following ISO 6579:2002 as amended (annex D). Among the isolated strains, some characteristics were selected to serotype, following the Kauffman and White method and to genetic characterization by genome macrorestriction using electrophoresis pulsed-field gel (PFGE).

92.0% of positivity was obtained in faecal samples but only 1.3% of the 150 cloacal swabs resulted positive. 34.0% of the egg shell samples tested a day after the laying were positive to *Salmonella* spp., but none of the egg contents samples were positive. In all cases, the serotype determined in faecal samples, cloacal swabs and eggs shells was *Enteritidis*.

The qualitative detection of the pathogen at high levels of contamination (92%) in laying hens faeces did not imply its presence in the egg contents. According to the results obtained, the need to evaluate quantitatively the presence of *Salmonella* spp. in the faeces is inferred to be able to establish a real correlation with the presence of the pathogen in the egg contents.

---

**Key words:** laying hen; faeces; swab; egg; *Salmonella*.

## INTRODUCCIÓN

Las *Salmonellas* son bacterias Gram negativas que forman parte de las  $\gamma$ -Proteobacterias y que pertenecen al género *Salmonella* de la familia Enterobacteriaceae. Se considera dos especies del género *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori*. Dentro de la especie *S. enterica* se distinguen 6 subespecies: *S. enterica indica*, *S. enterica salamae*, *S. enterica arizonae*, *S. enterica diarizonae*, *S. enterica houtenae* y *S. enterica enterica*.

El principal reservorio de la *Salmonella* es el intestino de animales vertebrados (mamíferos, incluyendo el hombre, y las aves) aunque es un microorganismo muy ubicuo. Éstos pueden padecer clínicamente la infección o comportarse como portadores asintomáticos. La eliminación al medio se realiza por vía fecal y la forma más importante de transmisión de la *Salmonella* spp. entre individuos es la ingestión de material contaminado por las heces de portadores o enfermos. Su resistencia en el medio ambiente gracias a la formación de biofilm (Joerger *et al.*, 2009; Sheffield *et al.*, 2009) y, en condiciones favorables, su capacidad de multiplicación en él, constituyen un factor crítico que facilita su difusión y mantenimiento, y dificulta su control.

Los huevos son una de las mayores fuentes de toxiinfección alimentaria por *Salmonella*. Se han descrito numerosos brotes de *Salmonella* por huevos y derivados (en 2005 el número de brotes por *Salmonella* en España fue de 284, que representa el 59.16% del total de brotes, según EFSA), aunque normalmente están asociados al consumo de huevos crudos o poco cocinados (Anonymous, 1990; Anonymous, 1996a, 1996b).

Así, con el objeto de reducir la prevalencia de *Salmonella* spp. en gallinas ponedoras adultas de la especie *Gallus gallus* cuyos huevos se destinan a comercialización para consumo humano, en España se estableció un Programa Nacional. Para alcanzar este objetivo se incluyeron medidas de vigilancia, de aplicación en todo el territorio nacional que tuvieron en cuenta lo establecido en el Reglamento (CE) Nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, en el Plan Sanitario Avícola (RD 328/03) y en la Orden/PRE/1377/05.

El Programa Nacional recoge la realización de autocontroles en heces en todas las explotaciones cuyos huevos se destinan al consumo humano directo y de controles oficiales en las que tengan un censo superior a 1000 aves, pero en ningún caso se contempla en este programa el análisis rutinario de los huevos destinados al consumo humano.

Actualmente, la legislación Nacional y Europea indica que si se confirma la presencia de *Salmonella* de ciertos serotipos (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) en heces, se procede a la destrucción de los huevos bajo control oficial debiendo ser tratados de conformidad con el Reglamento CE 1774/2002, o podrán ser trasladados a un establecimiento autorizado para la elaboración de ovoproductos a fin de ser sometidos a un tratamiento térmico que garantice la destrucción de la *Salmonella*, de acuerdo con la legislación comunitaria de higiene de los alimentos y con la normativa sobre comercialización de los huevos (Reglamento CE 1028/2006). Las consecuencias comerciales de estas medidas abocan, normalmente, en el sacrificio de los animales, aún cuando no se haya confirmado la presencia de la bacteria en el huevo, que es el producto que llega al consumidor final.

El primer objetivo de este trabajo fue observar la relación entre los resultados positivos a *Salmonella* en heces de gallinas ponedoras y los resultados obtenidos de los hisopos cloacales y exterior e interior de huevos correspondientes a esos animales. De este modo, pretendemos poner de manifiesto la relación entre los resultados positivos a *Salmonella* en los autocontroles en heces y el estatus sanitario de los huevos que finalmente llegan al consumidor. Para ello, se ha seleccionado una explotación de gallinas ponedoras, previa al sacrificio por ser positiva a *Salmonella* en autocontroles de heces. Se analizaron muestras de hisopos cloacales, heces y huevos (exterior e interior) de 1 día desde la fecha de puesta.

El segundo objetivo fue caracterizar las cepas aisladas para determinar posibles orígenes comunes entre las matrices en estudio. Así, de las muestras positivas a *Salmonella* spp. que se obtuvieron, se serotiparon algunas características de cada matriz (hisopos cloacales, heces, huevos exterior y huevos interior). Las cepas confirmadas como *Salmonella* Enteritidis se compararon mediante macrorrestricción genómica utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE: Pulsed Field Gel Electroforesis).

## MATERIAL Y MÉTODOS

La nave muestreada estaba incluida en una explotación de 4 naves con una capacidad total de 150.000 gallinas ponedoras comerciales Lohmann Brown alojadas en jaulas de 12 animales no acondicionadas y dispuestas en baterías de seis alturas. La superficie por animal, cm de comedero, número de tetinas, dimensiones de jaula e inclinación fueron acordes a la legislación vigente en materia de bienestar animal (Anexo II del RD 3/2002). Durante el muestreo en fase de puesta los animales se mantuvieron a 22°C con una iluminación de 16h diarias. Los animales provenían de una cría convencional en las que recibieron dos dosis de vacuna viva (*S. Enteritidis*; 2 y 8 semanas). Los animales fueron declarados positivos a *S. Enteritidis* las 24 semanas de edad en control oficial y autocontroles.

Se seleccionaron 50 jaulas de la explotación descrita, tomando de cada una los tres grupos de muestras siguientes: una muestra colectiva de heces de más de 150 gramos (simulando los autocontroles o controles oficiales). Esta muestra se tomó con las manos utilizando un par de guantes distinto para cada jaula para evitar contaminaciones cruzadas, y se depositó en una duquesa estéril de doble tapa de 500 ml. Tres muestras individuales de hisopos cloacales. Cada hisopo se analizó de forma independiente. Se utilizó un hisopo estéril que se introdujo en la cloaca de la gallina, luego se giró lentamente para tomar la muestra de fluidos. El hisopo fue conservado hasta su recepción en el laboratorio en un tubo estéril que contenía 10 ml de agua de peptona. Seis huevos de 1 día desde la fecha de puesta. Se analizó la parte interior y exterior. Para tomar la muestra de huevos se utilizó un par de guantes distinto para cada jaula. Cada grupo de 6 huevos se depositó en un cartón comercial nuevo hasta su recepción en el laboratorio.

Así, obtuvimos de las 50 jaulas las siguientes muestras: 50 muestras de heces, 150 muestras de hisopos cloacales y 100 muestras de huevos de 1 día desde la fecha de puesta (50 muestras de la parte interior y 50 de la exterior). Todas las muestras se transportaron al laboratorio aproximadamente dos horas después de la toma y se conservaron en refrigeración. Los hisopos cloacales, heces y huevos de 1 día desde la fecha de puesta fueron procesados el día de la toma y recepción en el laboratorio.

El método de aislamiento e identificación para las muestras del interior de los huevos fue realizado según la ISO 6579:2002. Los hisopos cloacales, heces y exterior de los huevos se analizaron según una modificación de esta norma ISO, en la que se utiliza el medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) como único medio de enriquecimiento selectivo. En primer lugar, se realizó el preenriquecimiento no selectivo de las muestras en una dilución 1:10 en agua de peptona incubando a  $37\pm 1$  °C durante  $18\pm 2$  horas. En el siguiente paso se procesaron de forma distinta las muestras de huevos interior y el resto de muestras.

Huevos interior: se transfirió 100  $\mu$ L del cultivo enriquecido a un tubo que contenía 10 mL de caldo de Rappaport-Vassiliadis con soja (caldo RVS de enriquecimiento selectivo) y 1 ml a un tubo con 10 mL de caldo de Muller-Kauffmann (caldo MKTTn de enriquecimiento selectivo). El tubo de caldo RVS se incubó a  $41.5\pm 1$  °C y el tubo con MKTTn a  $37\pm 1$  °C, ambos durante  $24\pm 3$  horas. Los cultivos de RVS y MKTTn se sembraron a XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato) y XLT4 (Xilosa-lisina-tergitol-4), que se incubaron a  $37\pm 1$  °C durante  $24\pm 3$  horas. Hisopos cloacales, heces y huevos exterior: se transfirió 100  $\mu$ L de la muestra enriquecida, en tres gotas, a una placa de medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV) y se incubó a  $41.5\pm 1$  °C durante  $24/48\pm 3$  horas. Se consideraron muestras sospechosas aquellas que presentaron halo en los puntos de inoculación de la muestra. A partir del cultivo obtenido, se sembraron los dos medios sólidos selectivos: XLD (Xilosa-lisina-desoxicolato) y XLT4 (Xilosa-lisina-tergitol-4), que se incubaron a  $37\pm 1$  °C durante  $24\pm 3$  horas.

Se seleccionaron 5 colonias sospechosas de XLD y XLT4, que se cultivaron en agar nutritivo a  $37 \pm 1$  °C durante  $24\pm 3$  horas. Finalmente, la confirmación bioquímica se realizó con tira API 20E (Biomerieux).

De acuerdo con la norma ISO 6579, tras la confirmación bioquímica de las colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*, hay que realizar la confirmación serológica y el serotipado de las mismas. Algunas cepas características aisladas de *Salmonella* spp. de cada matriz (hisopos cloacales, heces, huevos exterior y huevos interior) fueron serotipadas siguiendo el método de Kauffman-White (Patrick, 2007), consistente en trabajar con cultivos puros de la cepa a serotipar. Para ello se utilizó la técnica de aglutinación en placa con sueros anti-*Salmonella* preparados comercialmente, procediéndose a colocar una gota del antisuero en una placa de vidrio limpia, se suspendió posteriormente el cultivo directamente en la gota de antisuero con ayuda de un asa de siembra formando una suspensión homogénea y se mezcló con movimientos circulares. La presencia de aglutinación (observado sobre un fondo oscuro) se consideró positiva. Además, se trabajó enfrentando el cultivo inicialmente a antisueros (O/H) polivalentes para continuar con antisueros monovalentes hasta poder determinar los O, H1 y H2.

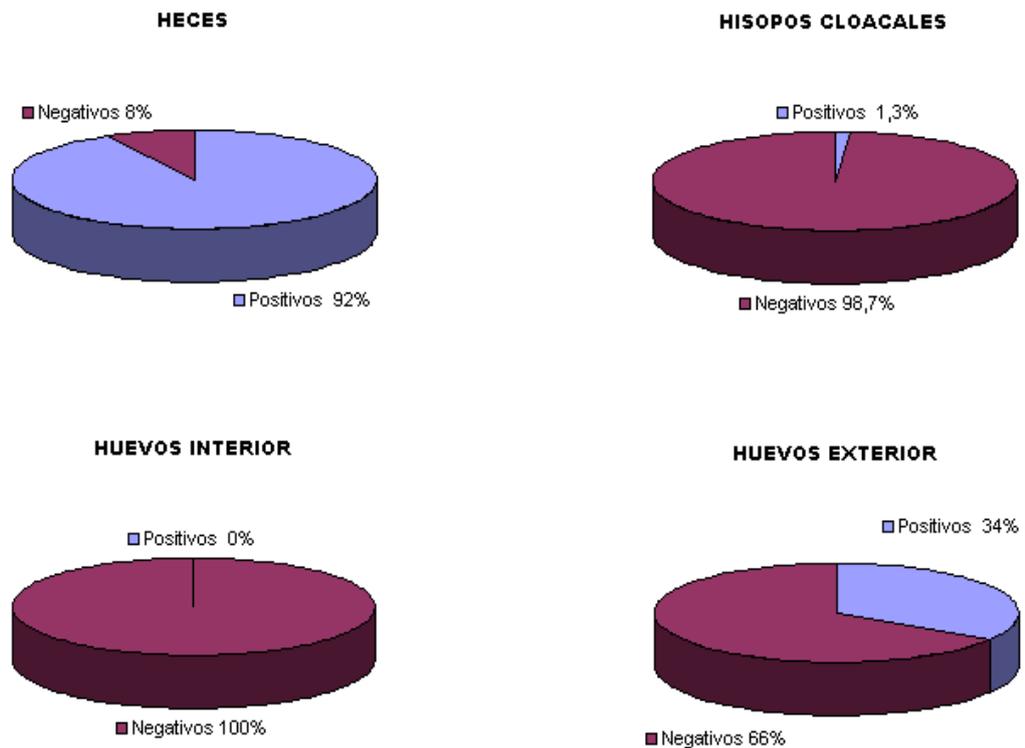
Ocho cepas de *Salmonella* Enteritidis obtenidas (2 cepas aisladas de hisopos cloacales, 3 cepas de heces y 3 cepas del exterior de huevos) de cada matriz se caracterizaron mediante macrorrestricción genómica utilizando la técnica de electroforesis en campo pulsante (PFGE). Esta técnica consiste en la comparación de grandes fragmentos (40 pares de bases) de ADN genómico tras la digestión con una enzima de restricción. Se compararon los patrones de bandas obtenidos al digerir el ADN total con la enzima XbaI y aplicar la técnica PFGE. Se siguió el protocolo descrito por Robot *et al.*, 2006. Los perfiles de bandas obtenidos con esta enzima permitieron discriminar entre las cepas de cada serovariedad estudiadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de *Salmonella* spp. en hisopos cloacales, heces y huevos de 1 día desde la fecha de puesta se muestran en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Resultados de los cultivos en las diferentes matrices estudiadas**

JAUJA	HECES	HISOPO 1	HISOPO 2	HISOPO 3	HUEVOS INTERIOR	HUEVOS EXTERIOR
Jaula 1	+	-	-	-	-	+
Jaula 2	+	-	-	-	-	-
Jaula 3	+	-	-	-	-	-
Jaula 4	+	-	-	-	-	-
Jaula 5	+	-	-	-	-	-
Jaula 6	+	-	-	-	-	-
Jaula 7	+	-	-	-	-	-
Jaula 8	+	-	-	-	-	-
Jaula 9	+	-	-	-	-	-
Jaula 10	+	-	-	-	-	+
Jaula 11	+	-	-	-	-	+
Jaula 12	+	-	-	+	-	+
Jaula 13	+	-	-	-	-	-
Jaula 14	+	-	-	-	-	-
Jaula 15	+	-	-	-	-	+
Jaula 16	+	-	-	-	-	+
Jaula 17	+	-	-	-	-	-
Jaula 18	+	-	-	-	-	+
Jaula 19	+	-	-	-	-	-
Jaula 20	+	-	-	-	-	-
Jaula 21	+	-	-	-	-	+
Jaula 22	+	-	-	-	-	-
Jaula 23	+	-	-	-	-	-
Jaula 24	+	-	-	-	-	-
Jaula 25	+	-	-	-	-	+
Jaula 26	+	-	-	-	-	-
Jaula 27	+	-	-	-	-	+
Jaula 28	+	-	-	-	-	-
Jaula 29	+	-	-	-	-	-
Jaula 30	+	-	-	-	-	-
Jaula 31	+	-	-	-	-	-
Jaula 32	+	-	-	-	-	-
Jaula 33	+	-	-	-	-	+
Jaula 34	+	-	-	-	-	+
Jaula 35	+	-	-	-	-	-
Jaula 36	-	-	-	-	-	+
Jaula 37	-	-	-	-	-	-
Jaula 38	+	-	-	-	-	-
Jaula 39	-	-	-	-	-	+
Jaula 40	-	-	-	-	-	-
Jaula 41	+	-	-	-	-	+
Jaula 42	+	-	-	-	-	-
Jaula 43	+	-	-	-	-	+
Jaula 44	+	-	-	-	-	+
Jaula 45	+	-	-	-	-	-
Jaula 46	+	-	-	-	-	-
Jaula 47	+	-	-	-	-	-
Jaula 48	+	-	-	+	-	-
Jaula 49	+	-	-	-	-	-
Jaula 50	+	-	-	-	-	-

**Figura 1. Resultados de *Salmonella* spp. en las diferentes matrices estudiadas**

Se serotiparon las siguientes muestras positivas a *Salmonella* spp.: Hisopos: Jaula 12 y jaula 48; heces: Jaula 4, jaula 15 y jaula 24 y huevos exterior: Jaula 16, jaula 41 y jaula 44. Todas las cepas serotipadas fueron determinadas como *S. Enteritidis* (9, 12 : g, m : -).

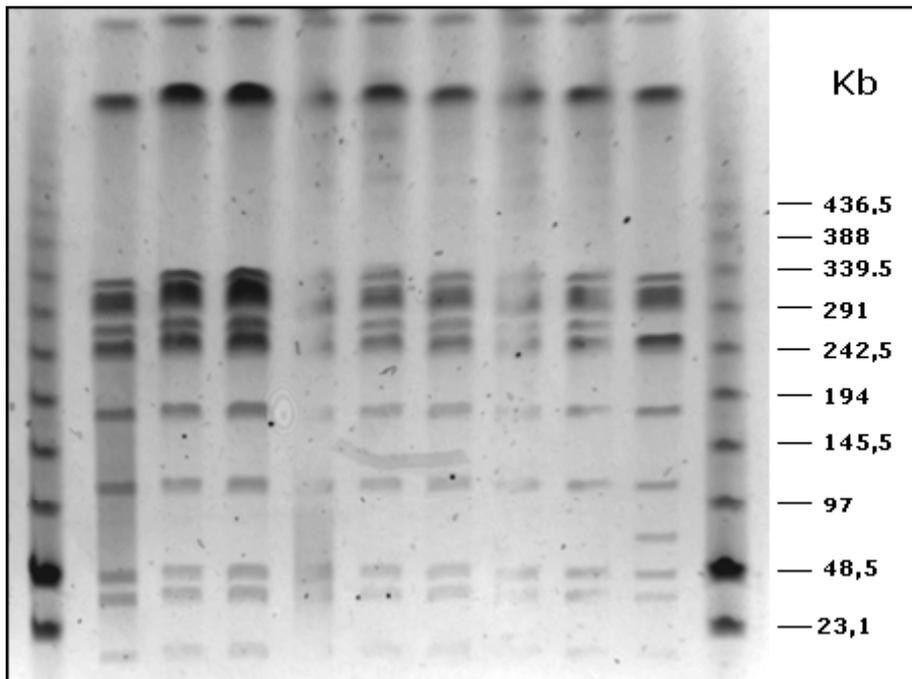
Siguiendo el procedimiento indicado, se compararon los patrones de bandas obtenidos al digerir el DNA total con la enzima XbaI y aplicar la técnica de PFGE (Figura 2) en las cepas detalladas anteriormente.

De los 150 hisopos cloacales analizados, únicamente 2 fueron positivos a *Salmonella* spp., lo que representó el 1.3% de los hisopos. En el caso de las heces, los resultados fueron muy diferentes ya que se han obtuvieron 46 positivos a *Salmonella* spp. de un total de 50 muestras, es decir, un 92.0% de positividad. En los resultados de los huevos analizados un día después desde la fecha de puesta, se distinguió la parte exterior e interior: no se obtuvieron resultados positivos a *Salmonella* spp. del análisis del interior de los huevos, sin embargo el 34.0% de las muestras de huevos analizados exteriormente fueron positivas a *Salmonella* spp.

En el caso de las aves, como en otras especies animales, la excreción de *Salmonella* a través de las heces es intermitente, coincidiendo habitualmente con situaciones estresantes, como el transporte, la mezcla de animales de edades diferentes, orígenes diferentes, o coincidencia con otras enfermedades, especialmente inmunosupresoras. Este hecho justificaría el bajo porcentaje (1.3%) de hisopos cloacales contaminados frente al elevado valor obtenido para heces (92.0%). La contaminación de las heces podría deberse a contaminación ambiental de la explotación.

**Figura 2. Perfiles de macrorrestricción genómica mediante PFGE tras digestión con la enzima XbaI de las cepas de *S. enterica* serovar Enteritidis. 11 bandas.**

Orden de izquierda a derecha: M, marcadores; E015; E016; E017; E018; E019; E020; E021; E022; LK5; M, marcadores



La presencia de *Salmonella* en la cáscara de los huevos (34.0%) evidencia el riesgo por contaminación horizontal (suelo, heces, ambiente, inapropiado almacenamiento, etc). Sin embargo, esta contaminación no afectó al contenido de los huevos ya que ésta es normalmente el resultado de la infección del tejido reproductivo (contaminación vertical), más que el paso a través de la cáscara después de la puesta del huevo (contaminación horizontal). La baja contaminación horizontal en los huevos (Baker *et al.*, 1980) se puede explicar por el desarrollo de una resistencia genética de las aves.

Existen dificultades a la hora de detectar *Salmonella* en huevos. Esto se debe, como ya se ha demostrado, a la baja prevalencia de huevos contaminados y a la presencia de sustancias inhibitoras en la albúmina del huevo. Sin embargo, la yema es altamente rica en hierro, lo que la hace un medio apropiado para el crecimiento de bacterias (Gast, 2005; Gast *et al.*, 2000; Humphrey *et al.*, 1991) comparado con la albúmina, que es deficiente en hierro. Por ello, en este trabajo se utilizó un pool de 6 huevos por cada muestra en el que se homogeneizó los contenidos del huevo previo al análisis para incrementar la posibilidad de detección y hacer de la yema un medio disponible para la bacteria.

Los resultados obtenidos con macrorrestricción genómica indican que las cepas estudiadas muestran el mismo perfil de bandas. Así, los patrones de bandas obtenidos con el enzima XbaI son iguales en las todas cepas estudiadas de las diferentes matrices. Esto indica que las cepas aisladas en todas las matrices comparten probablemente un origen común.

La detección cualitativa del patógeno a altos niveles (92.0%) en las heces de gallina ponedora no implicó la presencia del mismo en el interior del huevo. De estos resultados se desprende la necesidad de evaluar cuantitativamente la presencia de *Salmonella* spp. en las heces para poder establecer una correlación real con la presencia del patógeno en el interior del huevo.

Por otra parte, el origen de las cepas aisladas en las distintas matrices probablemente fue el mismo. La caracterización mediante PFGE de las cepas aisladas en distintas matrices de explotaciones avícolas contaminadas puede ser una herramienta útil para conocer mejor la epidemiología de *Salmonella* en el sector avícola, y por lo tanto, ayudar a su control.

## Agradecimientos

A Maria Pilar Cortés, del Departamento de Genética y Microbiología y Servicio de Análisis y de Aplicaciones Microbiológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona, y Montserrat Llagostera, del Departamento de Genética y Microbiología y Servicio de Análisis y de Aplicaciones Microbiológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona y Centro de Investigación en Sanidad Animal (CRESA).

## REFERENCIAS

- ANONYMOUS. (1990).** *Salmonella* Enteritidis infections and shell eggs. *Morb Mortal Wkly Rep.* **39:** 909-912.
- ANONYMOUS. (1996).** Outbreaks of *Salmonella* serotype Enteritidis infection associated with consumption of raw shell eggs. *Morb Mortal Wkly Rep.* **45:** 737-742.
- ANONYMOUS. (1996).** Salmonellosis associated with a thanksgiving dinner. *Morb Mortal Wkly Rep.* **45:** 1016-1017.
- BAKER, R.C. and GOFF, J.P. (1980).** Prevalence of *Salmonellae* on eggs from Poultry Farms in New York State. *Poultry Farms Science.* **59:** 289-92.
- GAST, R.K. (2005).** Bacterial infection of eggs. En: Food safety control in the poultry industry (G.C. Mead, ed.). Woodhead, Cambridge, UK, p. 1-20.
- GAST, R.K. and HOLT P.S. (2000).** Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poultry Science* **79:** 559-563.
- HUMPHREY, T.J., WHITEHEAD, A., GAWLER, A.H., HENLEY, A. and ROWE, B. (1991).** Numbers of *Salmonella* enteritidis in the contents of naturally contaminated hens' eggs. *Epidemiology and Infection* **106:** 489-496.
- JOERGER, R.D., SARTORI, C.A. and KNIEL, K.E. (2009).** Comparison of genetic and physiological properties of *Salmonella* enterica isolates from chickens reveals one major difference between serovar Kentucky and other serovars: response to acid. *Foodborne and Pathogen Diseases* **6:** 503-512
- PATRICK A.D. (2007).** Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9<sup>th</sup> edition. Institut Pasteur.
- PROGRAMA NACIONAL** para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en gallinas ponedoras de especie *Gallus gallus*. 2009.
- REAL DECRETO 3/2002**, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras.
- REGLAMENTO (CE) Nº 1774/2002** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- REGLAMENTO (CE) Nº 1028/2006** del Consejo, de 19 de junio de 2006, sobre las normas de comercialización de los huevos.

**RIBOT, E.M., FAIR, M.A., GAUTOM, R., CAMERON, D.N., HUNTER, S.B., SWAMINATHAN, B. and BARRETT, T.J. (2006).** Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogen and Diseases*.**3**: 59-67.

**SHEFFIELD, C.L., CRIPPEN, T.L., ANDREWS, K., BONGAERTS, R.J. and NISBET, D.J. (2009).** Characterization of planktonic and biofilm communities of day-of-hatch chicks cecal microflora and their resistance to *Salmonella* colonization. *Journal of Food Protection*. **72**: 959-65.

**UNE-EN ISO 6579:2003 ERRATUM: 2007 V2** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).

**UNE-EN ISO 6579:2003** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2002).

**UNE-EN ISO 6579:2003/A1:2007** Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Anexo D: Detección de *Salmonella* spp. en heces de animales y en muestras ambientales en la etapa de producción primaria. (ISO 6579:2002/Amd 1:2007).

