

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária

Cláudio Maurício Araújo Franco

**Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a
qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte**

BELO HORIZONTE

2021

Cláudio Maurício Araújo Franco

**Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a
qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção de não ruminantes

Prof. orientador: Prof. Leonardo José Camargos Lara

Belo Horizonte

2021

F825i Franco, Cláudio Maurício Araújo, 1971 -
Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a
qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte/
Cláudio Maurício Araújo Franco. – 2021.
118f: il.

Orientador: Leonardo José Camargo Lara
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia
Área de concentração: Produção Animal/Não Ruminantes
Bibliografia: f. 115 – 118.

1. Aves - Teses - 2. Microbiologia -Teses - I. Lara, Leonardo José
Camargo – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



Escola de Veterinária
(EVZ)

ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Av. Antônio Carlos 6627 - CP 567 - CEP 31223-970 - Belo Horizonte - MG
TELEFONE (31)-3409-2173

www.vet.ufmg.br/academicos/pos-graduacao
E-mail: cpgrzootec@vet.ufmg.br

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CLAUDIO MAURÍCIO ARAUJO FRANCO

As 08h30min do dia 28 de maio de 2021, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora de dissertação, aprovada em reunião ordinária no dia 19/03/2021, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada: **"Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a sua qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte"**, como requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, área de concentração Produção Animal.

Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Leonardo José Camargos Lara, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de dissertação, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

	Aprovada	Reprovada
Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza _____	☒	☐
Prof. Dr. Italo Conrado Sousa de Araújo _____	☒	☐
Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara _____	☒	☐

Pelas indicações, o (a) candidato (a) foi considerado (a): ☒ Aprovado (a)
☐ Reprovado (a)

Para concluir o Mestrado, o candidato deverá entregar 03 volumes encadernados da versão final da dissertação atestando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data defesa.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora e encaminhada juntamente com um exemplar da dissertação apresentada para defesa.

Belo Horizonte, 28 de maio de 2021.

Assinatura dos membros da banca:

Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara

Prof. Dr. Italo Conrado Sousa de Araújo

Marcelo Resende de Souza
CPF: 08654196615

Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza

Doutorado/AtaDefesa.doc

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Leonardo José Camargos Lara, pela excelência como mestre sempre focado na ciência e na formação técnica e ética de seus alunos.

Ao professor Marcelo Resende de Souza pelo apoio incondicional e por compartilhar seu precioso conhecimento.

Agradeço imensamente ao professor Itallo Conrado de Sousa Araújo pelas horas trabalhadas e disponibilidade para apresentar os resultados estatísticos, principalmente pela paciência e orientações prestadas.

Agradeço, por motivos iguais, ao professor Nelson Carneiro Baião e ao Dr. Júlio Henrique Emrich Pinto que, em conversas reservadas, de amigos para amigo, pelo incentivo fundamental para a realização desta tarefa, sabedores das dificuldades de conciliar o meu tempo de trabalho, minha vida pessoal e o mestrado.

Agradeço a Avivar Alimentos, em especial aos seus diretores por abrir as portas para o experimento em um momento tão difícil para todos nós, onde estávamos com muitas dúvidas das ações a serem tomadas e quais perspectivas futuras sobre a pandemia.

Agradeço de coração ao Dr. Leonardo Ruiz (compadre e irmão) por acreditar em mim e dispensar parte de seu precioso tempo para me ajudar, além de ter dado todo o aporte informativo para a administração da Avivar Alimentos e para a confecção do trabalho.

Agradeço aos colaboradores da Avivar, em especial ao Sr. Antenor Libério, Ana Carolina Teixeira, Lorrainy Longuinho, Flávia Camargos e Regiana Souza que, sem eles, seria impossível a realização desta tarefa. Não posso esquecer de todos os colaboradores da granja Gameleira que participaram de forma direta e indireta do experimento. Todos foram fundamentais pelos trabalhos prestados, bem como as instruções das rotinas da granja de matrizes.

Agradecimentos eternos para a empresa que me forneceu todo o suporte para iniciar e finalizar o meu mestrado. Serei eternamente grato pela Vaccinar por renunciar de parte do meu tempo e me apoiar nesta jornada, em especial ao Sr. Nelson Lopes, incentivador de muitos que pretendem continuar em aprimorar os conhecimentos e agregar valores ao agronegócio brasileiro.

Aos meus incansáveis amigos da UFMG que me deram o apoio moral e operacional em todas as fases do experimento, em especial à Bárbara Mol, Bruno Antunes, Hítalo Barbosa, Lorena Salim, Tainá Brandão, Isadora Araújo, Cláudio Nunes, Erivelto Vilela, Thayná Gonçalves e

Ketryn Leal. Agradeço também à minha amiga Marcela Triginelli pela presteza em me atender e estar sempre disponível quando necessitei.

A todos ligados ao laboratório de microbiologia, principalmente ao Cosme Barbosa, Gustavo Valente, César e Isabela Maciel por compartilhar os conhecimentos e por conduzirem com muita competência os trabalhos executados no laboratório.

Agradeço a Thaís Franco e aos meus queridos filhos, Gabriel Franco e Leonardo Franco os quais nas horas difíceis me apoiaram e levantaram meu astral, em especial minha esposa que me ajudou na organização das minhas tabelas, planilhas, leituras, tudo com paciência e bom humor. Thaís, sem você não seria possível alcançar o meu objetivo, agradeço por estar ao meu lado.

Minha querida mãe que, com certeza, sempre com suas orações para me abençoar e suas palavras de incentivo. Da mesma forma, a todos os meus familiares que me impulsionaram durante toda a minha jornada.

Ao meu amado pai, ao lado do Papai do céu, está orgulhoso do filho, como sempre comentava.

À Escola de Veterinária da UFMG por toda a estrutura e apoio,

Ao colegiado de pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

Aos responsáveis pelo LAMA

A todos aqueles que, de forma direta e indireta, me incentivaram e me ajudaram.

Por fim, ao meu bom Deus!

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos do momento da sanitização por fumigação de ovos férteis limpos de ninho e ovos de cama de matrizes pesadas da linhagem Cobb® às 62 semanas de idade sobre as contagens microbiológicas da superfície da casca e conteúdo do ovo, rendimento de incubação, qualidade do pinto de um dia, contagens microbiológicas do saco vitelínico e conteúdo cecal dos pintos de um dia, bem como o desempenho dos frangos de 1 a 35 dias. Foram utilizados 3344 ovos para avaliação dos parâmetros de incubação, 312 pintos de 1 dia para avaliação de desempenho e 128 ovos para avaliação microbiológica, divididos em um arranjo fatorial 2x2 com dois tipos de ovos (ovos limpos de ninho ou ovos de cama) e dois momentos de sanitização (30 minutos ou 2 horas após a coleta). Foram realizadas coletas com suabes nas superfícies de pontos estratégicos do galpão (ninhos, esteiras, piso) e análise microbiológica da casca e conteúdo dos ovos antes da aplicação dos tratamentos. Essas coletas e análises foram utilizadas para caracterizar a microbiota presente nas áreas de criação das matrizes, bem como na casca e conteúdo do ovo no momento da experimentação. Sanitizar ovos limpos de ninho 30 minutos após a coleta reduziu significativamente a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais e enterobactérias do saco vitelínico, bem como a contagem de bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal ($P<0,05$). Ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta aumentou a contagem de bactérias mesófilas totais e enterobactérias do saco vitelínico, além da contagem de bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal ($P<0,05$). Sobre o rendimento de incubação, ovos de cama, independentemente do momento da sanitização, apresentaram maior índice de contaminados durante a incubação. Ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta apresentaram maior mortalidade inicial (0 a 7 dias) ($P<0,05$). Ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta apresentaram maior mortalidade embrionária inicial (0 a 7) ($P<0,05$). Sobre o desempenho do frango de corte, pintos provenientes de ovos limpos de ninho apresentaram menor viabilidade aos 7 dias de vida ($P<0,05$). Não foi identificado o gênero *Salmonella* no conteúdo dos ovos dos tratamentos preconizados, entretanto, o gênero *Pseudomonas* foi identificado. O estudo demonstrou potencial para o momento de sanitização de ovos de cama até 30 minutos após a coleta, com influência positiva sobre o desempenho do frango de corte que apresentou maior viabilidade e Índice de Eficiência Produtiva aos 35 dias que ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta.

Palavras-chave: Microbiologia; desinfecção; fumigação, matriz pesada; ovos contaminados; ovos incubáveis.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effects of the time of sanitization by fumigation of clean fertile nest eggs and floor eggs from broiler breeders of the Cobb strain at 62 weeks of age on how microbiological counts of the shell surface and egg content, yield incubation rate, quality of chick post-hatch, microbiological counts of yolk sac and cecal content of chick post-hatch and the performance of the progeny. A total of 3344 eggs were used to evaluate the incubation parameters, 312 1-day-old chicks for performance evaluation and 128 egg for microbiological evaluation, divided into a 2x2 factorial arrangement with two types of eggs (clean nest eggs or floor eggs) and two moments of sanitization (30 minutes or 2 hours after collection). Swabs were smeared on the surfaces of strategic points in the aviary (nests, mats, floor) and microbiological analysis of the shell and content of the eggs before the application of the treatments. These collections and analyzes were used to characterize the microbiota present in the breeding areas of the broiler breeders, as well as in the eggshell and content of the eggs at the time of experimentation. Sanitizing clean nest eggs 30 minutes after collection significantly reduced the count of total aerobic mesophilic bacteria and enterobacteria in the yolk sac, as well as the count of lactic acid bacteria in the cecal content ($P<0.05$). Floor eggs sanitized 30 minutes after collection increased the count of total mesophilic bacteria and enterobacteria in the yolk sac, in addition to the count of lactic acid bacteria in the cecal content ($P<0.05$). Regarding the incubation yield, floor eggs, regardless of the time of sanitation, showed a higher index of contaminated eggs during incubation. In addition, clean nest eggs sanitized 30 minutes after collection showed higher initial mortality (0 to 7 days) ($P<0.05$). Floor eggs sanitized two hours after collection showed higher initial embryonic mortality (0 a 7) ($P<0,05$). Chicks from clean nest eggs showed less viability at 7 days of age than chicks from floor eggs ($P<0.05$). Regarding progeny performance, chicks from sanitized floor eggs two hours after collection showed less viability and a lower production efficiency index (IEP) at 35 days of age ($P<0.05$). The genus *Salmonella* was not identified in the recommended treatments; however, the genus *Pseudomonas* was identified. The study showed potential for the time to sanitize floor eggs up to 30 minutes

after collection, with a positive influence on the performance of the progeny that showed greater viability and Productive Efficiency Index at 35 days than sanitized floor eggs two hours after collection.

Keywords: Microbiology; disinfection; fumigation; Broiler breeders; contaminated eggs; hatching eggs

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Proteínas do ovo, proporções e atividade -----	22
--	----

Tabela 2. Alterações ocorridas em ovos contaminados por culturas puras de <i>Pseudomonas</i> -----	47
--	----

Quadro 1. Ultraestruturas da casca do ovo -----	25
---	----

CAPÍTULO II - Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte-----	66
--	-----------

Tabela 1. Microbiologia da superfície da superfície da casca e conteúdo dos ovos de cama ou ninho sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta-----	79
--	----

Tabela 2. Contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais (BMT) do saco vitelínico, contagem de enterobactérias (ENTER) do saco vitelínico e conteúdo cecal e bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal (BAL) de pintos neonatos UFC/mL log10 de acordo com os tratamentos -----	80
---	----

Tabela 3. Contagem de BMT do saco vitelínico em log10 UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos -----	80
---	----

Tabela 4. Contagem de ENTER do saco vitelínico em log10 UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos -----	80
---	----

Tabela 5. Contagem de BAL do conteúdo cecal em log10 UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos -----	80
--	----

Tabela 6. Número e frequência de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Pseudomonas spp.</i> identificadas no método de MALDI-TOF das colônias selecionadas do conteúdo do ovo antes da sanitização e para cada tratamento preconizado ----	87
--	----

Tabela 7. Número e frequência de bactérias identificadas no método de MALDI-TOF por gênero e espécie de colônias selecionadas de sacos vitelínicos de 12 pintos de um dia para cada tratamento: ovos limpos de ninho ou cama sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta -----	89
Tabela 8. Número e frequência de bactérias identificadas pelo método de MALDI-TOF por gênero e espécie de colônias selecionadas de conteúdo cecais de 12 pintos de um dia para cada tratamento: ovos limpos de ninho ou cama sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta -----	92
Tabela 9. Percentual médio da fertilidade (Fert.), eclodibilidade do número total de ovos incubados (Eclod), eclodibilidade do número total de ovos férteis incubados (Eclod fert.) de acordo com os tratamentos-----	93
Tabela 10. Embriodiagnóstico de ovos limpos de ninho e de cama sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta -----	94
Tabela 11. Mortalidade embrionária inicial (0 a 7 dias de incubação) de ovos de cama ou de ninho sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta ---	94
Tabela 12. Percentual médio de pintos de segunda, qualidade do umbigo (tipo 1, tipo 2, tipo 3), percentual de pintinhos com abdômen volumoso e eliminados de acordo com os tratamentos -----	95
Tabela 13. Peso dos pintos (g), em gramas, peso relativo médio do saco vitelínicos (%), peso dos pintos sem o saco vitelínicos (%) de acordo com os tratamentos -----	96
Tabela 14. Desempenho de frango de corte aos sete dias de idade de acordo com os tratamentos -----	96

Tabela 15. Desempenho de frango de corte aos 14 dias de idade de acordo com os tratamentos -----	97
Tabela 16. Desempenho de frango de corte aos 21 dias de idade de acordo com os tratamentos -----	97
Tabela 17. Desempenho de frango de corte aos 28 dias de idade de acordo com os tratamentos -----	98
Tabela 18. Desempenho de frango de corte aos 35 dias de acordo com os tratamentos -----	98
Tabela 19. Viabilidade (%) aos 35 dias de acordo com os tratamentos -----	98
Tabela 20. Índice de eficiência produtiva (IEP) aos 35 dias de acordo com os tratamentos -----	99
Tabela 21. Contagem de microrganismos da superfície casca e conteúdo dos ovos limpos de ninho ou de cama refrigerado aos 30 minutos ou 120 minutos após a coleta de cama de acordo com o momento do resfriamento -----	113
Gráfico 1. Composição da microbiota identificada pelo MALDI-TOF no ambiente de granja, divididos por boca de ninhos, esteiras de ovos e a cama, calculados a partir do total de colônias identificadas -----	82
Gráfico 2. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF nos ambientes de granja (ninho, esteiras de ovos e cama) -----	82
Gráfico 3. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF da casca do ovo de ovos coletados e refrigerados em tempos predeterminados -----	84

Gráfico 4. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF da casca do ovo de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados para os tratamentos -----	85
Gráfico 5. Identificação pelo método MADI-TOF da composição da microbiota de sacos vitelínicos de pintos de um dia provenientes de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados, de acordo com os tratamentos -----	88
Gráfico 6. Identificação pelo método MADI-TOF da composição da microbiota do conteúdo cecal de pintos de um dia provenientes de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados, de acordo com os tratamentos -----	91

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Estrutura do ovo -----	19
Figura 2. Esquema da formação e postura do ovo -----	20
Figura 3. Folículos de fase de crescimento intermediário e de fase rápida de crescimento -----	21
Figura 4. Esquema morfológica da casca do ovo -----	24
Figura 5. Classificação na sequência: ovo grande ou duas gemas, pequeno ou industrial, deformado, trincado, sujo ou de cama, ovo sem casca, ovo incubável -----	28
Figura 6. Onfalite em pintos de um dia (umbigo infectado) e quadro septicêmico na necropsia ao quinto dia, em decorrência do quadro (pericardite, Peri hepatite e peritonite) -----	45
Figura 7. Ovo contaminado no interior da máquina de incubação e no momento de quebra no embriodiagnóstico, após a eclosão -----	46

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	19
1. Formação do ovo	19
1.1 Formação da gema	21
1.2 Formação do albúmen	22
1.3 Casca do ovo	22
2. Manejo de coleta dos ovos de ninho e cama	26
3. Classificação de ovos nas granjas	27
3.1 Ovos de cama e suas características	28
3.1.1 Fatores que influenciam a postura na cama	30
3.1.1.1 Genética e comportamento	30
3.1.1.2 Idade da matriz	31
3.1.1.3 Mão-de-obra e manejo	32
3.1.1.4 Instalações, ninhos e demais equipamentos	33
4. Sanitização de ovos incubáveis – Fumigação	34
5. Momento da sanitização de ovos incubáveis	35
6. Vias de contaminação de ovos incubáveis no ambiente de produção	36
7. Pontos críticos da contaminação de ovos incubáveis	37
7.1 Fatores extrínsecos	37
7.2 Fatores intrínsecos	38
8. Microbioma do ovo	39
8.1 Bactérias mesófilas aeróbicas totais	40
8.2 Enterobactérias	40
8.3 <i>Salmonella</i> spp.	40
8.4 <i>Escherichia coli</i>	43
8.4.1 Contaminação do saco vitelínico e umbigo (onfalite)	44
8.5 <i>Pseudomonas</i> spp.	45
9. Microbioma cecal	47
9.1 Microrganismo benéficos	48
9.2 Microrganismo indesejáveis	49
9.2.1 <i>Clostridium</i> spp.	49
9.2.2 <i>Campylobacter</i> spp.	50

10.	Referências bibliográficas -----	51
-----	----------------------------------	----

**CAPÍTULO II - Influência do momento da sanitização de ovos de
ninho e de cama sobre a qualidade microbiológica, incubação e**

desempenho de frangos de corte-----	66
Resumo-----	66
Abstract -----	67
Introdução -----	69
Material e método -----	70
Resultados -----	79
Discussão -----	100
Considerações finais-----	111
Anexo I-----	113
Referências bibliográficas-----	114

INTRODUÇÃO

A qualidade do pinto de um dia pode impactar nos resultados de desempenho e no custo da produção do frango de corte e está ligada diretamente à qualidade dos ovos incubáveis produzidos nas granjas de matrizes de corte. Em situações de forte demanda pelo pinto de um dia e consequentemente por ovos incubáveis, as granjas de matrizes maximizam o aproveitamento de ovos de segunda, ou seja, ovos sujos, ovos de cama e até deformados. Contudo, esse quadro pode comprometer diretamente a progênie, pois ovos qualificados de segunda não conseguem atender aos critérios de qualidade, principalmente quando os ovos de cama são utilizados, pois eles são frequentemente mais sujos (Berrang et al., 1997) e contêm maior carga bacteriana na superfície da casca (De Reu et al. 2011). Além disso, ovos de cama elevam a contaminação da planta do incubatório e podem influenciar a mortalidade embrionária em todas as fases de incubação e potencializar a contaminação de pintos de um dia provenientes deste tipo de ovo, com características de quadros inflamatórios do saco vitelínico, umbigo ou ambos (onfalite) e maiores índices de mortalidades nas primeiras semanas após o alojamento (com possíveis reflexos negativos nas fases subsequentes da fase de produção (Jabbar e Ditta, 2017).

Para reduzir o problema, ovos de cama devem ser tratados de forma exclusiva nas dependências das empresas produtoras de pintos de um dia. De forma geral, este tipo de ovo é separado, classificado e incubado separadamente dos ovos limpos ou nas bandejas mais baixas nos carrinhos ou prateleiras de incubação, entretanto, várias empresas negligenciam ou não aderem ao manejo adequado do ovo de cama, elegendo a forma mais fácil de solucionar a questão, ou seja, aderem ao descarte deste tipo de ovo, classificando-o como não incubável.

Desta forma, ovos de cama descartados podem impactar sensivelmente no custo de produção. Como exemplo, ao considerar um aviário com 10.000 fêmeas em fase de produção que apresentam índices zootécnicos no final da produção compatíveis aos recomendados pelas linhagens comerciais, por exemplo, de acordo com Manual Cobb, 2019) com postura média de 65%, e se o percentual médio de ovos de cama apresentado for de 5% no final do ciclo de produção, isso daria uma perda financeira de R\$ 292,50/dia ou um total de R\$ 83.947,50 por um ciclo de produção de 41 semanas, ou seja, no período de 24 a 65 semanas de vida da ave.

No ambiente das granjas, é desejável manejar ovos de cama de forma diferenciada, ou seja, coletar e sanitizar o mais breve possível aqueles que se apresentam viáveis (Araújo e Albino 2011), antes mesmo do seu esfriamento. Entretanto, os critérios de seleção, limpeza e tempo para o início da sanitização após a coleta geralmente são negligenciados, visto que ovos de cama são os últimos de cada coleta a serem manipulados. Desta forma, o intervalo entre a coleta e a sanitização de ovos de cama pode perdurar até duas horas ou mais pós coleta, tempo suficiente para esfriá-lo e aumentar as chances dos microrganismos penetrarem em seu interior, maximizando a contaminação interna e proporcionando ineficiência de sanitizações futuras. Entretanto, o contato dos ovos de cama mal manejados com ovos limpos pode aumentar a pressão da carga microbiológica por fungos e bactérias nas incubadoras e, conseqüentemente, os desafios sanitários (Buhr et al., 1994).

O paraformaldeído, na forma de gás (fumigação), é o agente químico mais utilizado para a sanitização de ovos incubáveis. De acordo com Clímaco et al. (2018), ovos de ninho sanitizados com paraformaldeído apresentam menor contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais na superfície da casca que demais sanitizantes utilizados na avicultura (Ácido Peracético, irradiação com Luz Ultravioleta tipo C, Peróxido de Hidrogênio, Ozônio). Contudo, a sua manipulação pode ser considerada de risco profissional (Costa, 2008). Além disso, para o bom manejo de sanitização fatores físicos devem ser criteriosamente respeitados no processo de fumigação, como a temperatura, umidade relativa do ar e o tempo de exposição do ovo químico e, por fim, um intervalo máximo da coleta até a realização do procedimento de sanitização de 30 minutos (Araújo e Albino, 2011).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito do momento de sanitização de ovos limpos de ninho e ovos de cama (30 minutos após a coleta e 120 minutos após a coleta) sobre a contagem e caracterização microbiana na casca e conteúdo do ovo, conteúdo do saco vitelínico e conteúdo cecal, rendimento de incubação, qualidade do pinto de um dia e desempenho do frango de corte.

CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1. Formação do ovo

O ovo da galinha doméstica é constituído por um corpo unicelular formado no ovário e oviduto das aves (Ornellas, 2001). A sua formação varia entre 23 a 26 horas (Mine e Kovacs-Nolan, 2004). Possui três componentes básicos em sua composição, a casca, a gema e o albúmen (Nascimento e Salle, 2003). Estes componentes são fundamentais para a formação do embrião, com fornecimento de nutrientes específicos e mobilizados partir de cada um deles (Schmidt et al., 2003).

A casca tem como função principal de proteger o ovo do ambiente externo, além de ser responsável pelas trocas gasosas e fonte de cálcio para o embrião. A gema não é a célula reprodutiva em si, entretanto, é principal fonte de alimento que sustenta o desenvolvimento a partir da célula blastoderma e seu respectivo embrião. O albúmen é uma solução aquosa de proteínas situadas entre a membrana da casca e a gema do ovo e tem como função principal a proteção e, em segundo plano, fornece nutrientes ao embrião. Em menores proporções, a estrutura do ovo apresenta ainda o blastodisco (disco germinativo que transporta o material cromossômico do óvulo), chalazas, membranas internas e externas da casca, câmara de ar e a cutícula da casca (Rose, 1997) – Figura 1.

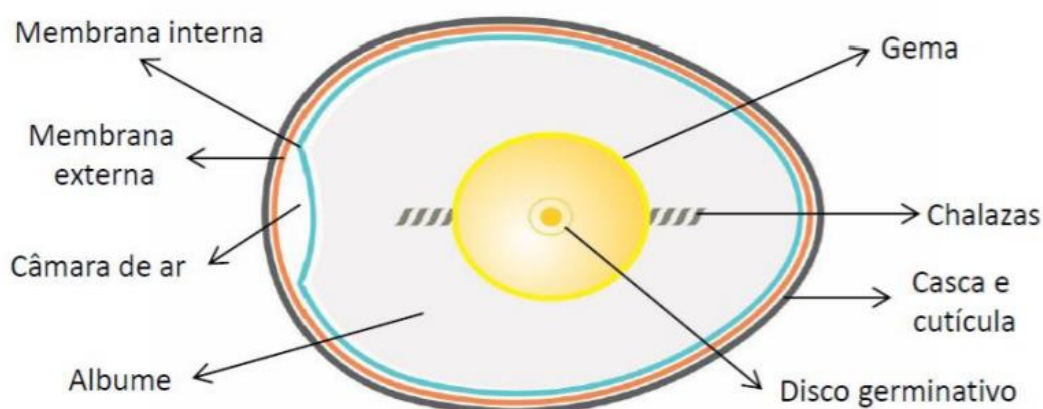


Figura 1: estrutura do ovo. Adaptado de Barbosa, (2013).

O sistema reprodutor das galinhas é composto apenas pelo ovário e oviduto esquerdo funcional (Burke, 1996). De acordo com Bahr e Johnson (1991), substâncias inibidoras do ducto de Muller não permitem o desenvolvimento do ducto e do ovário direito. Os autores ainda afirmaram que a não regressão do ducto e ovário esquerdo é devido ao maior número de receptores de estrogênio, o que pode ser responsável por impedir a ação da substância no ducto de Muller.

O início da formação do ovo (Figura 2) se dá com o rompimento do folículo ovariano maduro e a liberação do óvulo (gema ou oócisto) para o oviduto, dividido em cinco partes (Stadelman e Cotteril, 1994). Solomon (1991) descreveu que logo após a ovulação, a gema inicia seu percurso pelo ovário, começando pelo infundíbulo, responsável pela captura do ovo. É neste compartimento do ovário que também ocorre a fertilização do oócisto. Em seguida, no magno, é iniciado o processo de adição da parte mais densa do albúmen. Logo após, dar-se entrada na terceira parte do ovário, o istmo, responsável pela formação das membranas interna e externa. Seguindo o curso de formação, o ovo alcança o útero ou glândula da casca e é iniciada a adição do fluido do ovo e a formação da casca e da cutícula. No último estágio de formação, o ovo é armazenado na vagina, além de ser a passagem do útero até a cloaca da ave. A vagina também é responsável pelo armazenamento de espermatozoides. A câmara de ar é formada logo após a postura, pela diferença de temperatura interna e externa (Stadelman e Cotteril, 1994).

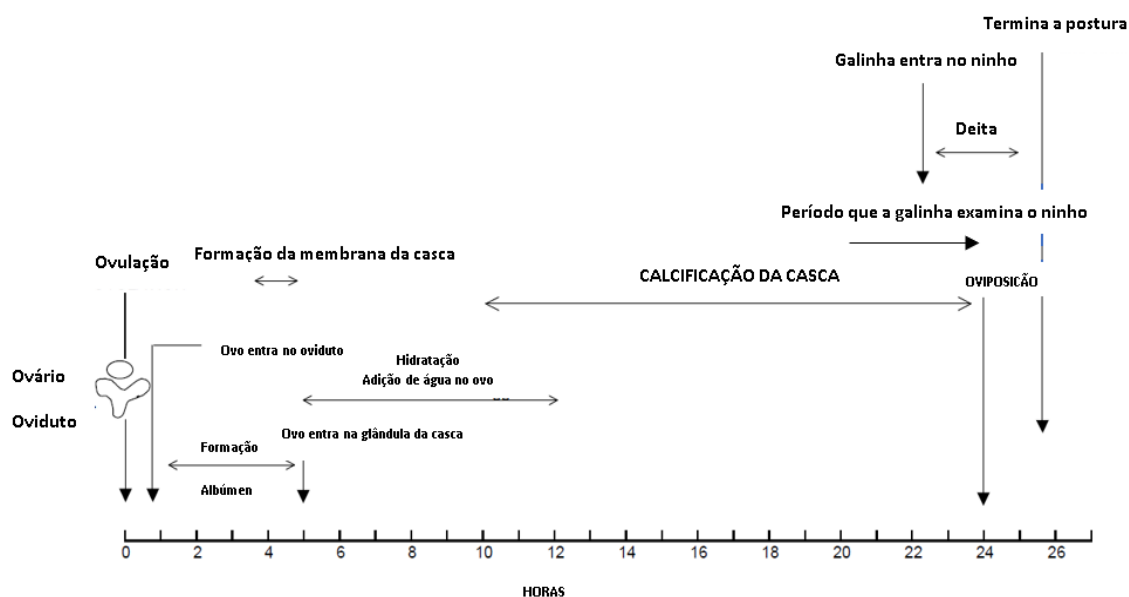


Figura 2. Esquema da formação e postura do ovo (Adaptado de Gilbert (1971)).

1.1 Formação da gema

A gema é descrita por Nascimento e Salle (2003) como uma esfera levemente alongada, circunscrita pela membrana da gema vitelina e mantidas na região central do ovo pelas chalazas. Os componentes são produzidos pelo fígado pela ação direta do hormônio estrógeno e transportados pelo sangue até os folículos do ovário (Mine e Kovasc-Nolan, 2004). De acordo com Kan e Petz (2000), o ovário das galinhas em atividade possui três tipos de folículos, os quais as gemas são depositadas. São eles:

- Folículos pequenos em fase lenta de desenvolvimento. Estes podem levar meses ou até anos para se desenvolverem. São chamados também de folículos brancos por não haver depósitos de carotenoides.
- Folículos intermediários. Sua fase de desenvolvimento dura aproximadamente 60 dias.
- Folículos de crescimento rápido. Sua fase de desenvolvimento é de 10 dias. Neste período aumenta o seu peso de um grama para 20 gramas e é formado por camadas, as quais são depositadas de forma concêntrica, uma após a outra. Cada folículo está disposto no ovário em vários estágios de desenvolvimento e pode ser ovulado a cada de 24 horas (Figura 3).



Figura 3. Folículos de fase de crescimento intermediário e de fase rápida de crescimento (Donoghue e Myers, 2000)

1.2 Formação do albúmen

O albúmen representa em torno de 60% do peso do ovo, e suas funções são basicamente a proteção e fonte de nutrientes ao embrião. Ele pode ser dividido em quatro camadas (chalazas, camada interna fina fluida, camada grossa externa, camada fina fluida externa) e, segundo (Johnson 2015), a sua maior parte é secretada no magno, onde as proteínas do albúmen levam de um a dois dias para serem produzidas e a sua deposição sobre a gema acontece por volta de duas a três horas após a ovulação (Roberts e Brackpool, 1994). Os mesmos autores afirmaram que a concentração do albúmen no magno representa apenas metade do volume existente no ovo recém posto. Os demais componentes (água, glicose e eletrólitos) são adicionados ao albúmen na glândula da casca, produzindo assim, o seu volume final.

De forma geral, o albúmen tem baixa contaminação por microrganismos. Isto se deve aos fatores antimicrobianos existentes em sua composição (Deeming, 2002). Pode-se destacar a lisozima, riboflavina, ovomucoide, avidina e a ovotransferrina (Tabela 1). Esta última constitui 13% das proteínas do albúmen. Ela é responsável por tornar o meio deficiente em ferro, com prejuízos à multiplicação de microrganismos dependentes do mineral (Baron et al., 1997; Croguennec et al., 1999 e Johnson, 2015).

Tabela 1. Proteínas do ovo, proporções e atividade

Proteína/Proporção	Atividade
Ovoalbumina/54%	antibacteriana, anti-hipertensiva, moduladora do sistema imunitário
Ovotransferrina/12%	antimicrobiana, antibacteriana, moduladora do sistema imunitário
Ovomucoide/11%	moduladora do sistema imunitário, inibidora de proteases específicas
Ovomucina/3,5%	antimicrobiana, inibidora de crescimento de células cancerígenas
Lisozima/3,4%	antibacteriana, antiviral, modula o sistema imunitário, inibidora do crescimento de células cancerígenas
Ovostatina/0,05%	antimicrobiana, inibidora de crescimento de células cancerígenas, moduladora do sistema imunitário
Avidina/0,05%	Antibacteriana

Adaptado de kovacs-Nolan et al. (2005)

1.3 Casca do ovo

A casca do ovo é responsável por proteger o embrião do meio externo e de microrganismos patogênicos, realizar trocas gasosas com o meio externo, controlar a perda excessiva de água, além de ser fonte de cálcio para a formação do embrião (Oliveira e Oliveira, 2013). A qualidade da casca é reduzida com a idade da matriz, visto que os ovos aumentam de peso, modificam a composição e espessura da casca (Máchal e Simeonovová, 2002). A casca não pode apresentar trincas e ondulações, deve possuir coloração adequada e livre de sujidades e excretas, reduzindo ao máximo o risco de contaminação.

De acordo com (MacDaniel et al., 1978), problemas relacionados com a qualidade externa da casca interfere diretamente no aumento da mortalidade embrionária e sobre a qualidade da progênie. Após a postura, a qualidade da casca pode ser mantida ou piorada, entretanto, dificilmente melhorada. Os principais fatores que interferem na qualidade da casca são a genética, idade da matriz, nutrição, sanidade, manejo e condições ambientais (Vasconcelos, 2018).

A formação da casca dura aproximadamente 20 horas no interior do útero, tempo para a deposição dos sais de cálcio. Este período pode ser dividido em dois momentos, o primeiro quando há a calcificação lenta, com duração de quatro horas, logo em seguida, o evento principal, com absorção de água, sais e glicose. Esta hidratação leva ao esticamento da casca e, conseqüentemente, separa e expõe os cones mamilares, podendo ser o estímulo principal para a segunda fase de calcificação, denominada calcificação rápida (Robert e Brackpool, 1994).

Estruturada por fibras proteicas e por colunas de cristais de carbonato de cálcio, segundo Ornellas (2001) a casca do ovo é composta por substâncias orgânicas e minerais, com o percentual de 94% de carbonato de cálcio (CaCO_3), 1,4% de carbonado de magnésio (MgCO_3) e 3% de glicoproteínas, mucoproteínas, colágeno e mucopolissacarídeos, num total de 8 a 12% do peso total do ovo. Em matrizes jovens há a retenção de aproximadamente 60% do cálcio absorvido, contudo, aves mais velhas esta retenção em média é de apenas 40% (Baião e Cançado, 1997), sendo, portanto, mais um fator que colabora com a redução da qualidade da casca com o avançar da idade das matrizes. Schmidt et al, (2003) estudaram os índices da qualidade da casca e rendimento de incubação e concluíram que a espessura da

casca entre 0,33 a 0,35 mm é considerada ótima, enquanto espessura da casca inferior a 0,27 mm, reduz as chances de sobrevivência do embrião até o final da incubação

A casca é porosa e, de acordo com Benites et al. (2005), estes orifícios são recobertos pela cutícula, uma das seis ultraestruturas encontradas na casca do ovo (membrana da casca interna, membrana da casca externa, camada mamilar, camada paliçada, camada de cristal vertical e cutícula) (Figura 4; Quadro 1). Os poros têm a função de difusão das trocas gasosas, liberando dióxido de carbono e umidade e a entrada de oxigênio (Stadelman e Cotterill, 1977). Os poros não são uniformemente distribuídos pela superfície da casca, em quantidade e tamanho e as suas formações ocorrem ao nível da camada mamilar, ou seja, quando grupos de 4 a 5 núcleos mamilares crescem, criam um espaço central, os quais se caracterizam por formar sítios de trocas funcionais, estendendo por toda a casca do ovo (Solomon, 2010).

A câmara de ar é formada no polo maior do ovo e é desenvolvida logo após a postura e acontece pela diferença do gradiente de temperatura entre os meios interno e externo. A câmara é preenchida pelo ar que penetra pelos poros da casca (Magalhães, 2007). De acordo com Oliveira e Oliveira (2013), a principal funcionalidade da câmara de ar é permitir trocas gasosas entre o embrião e o meio externo na fase final de incubação. Segundo os autores, o tamanho da câmara aumenta com o avançar da idade do ovo, sendo, inclusive, esta característica utilizada para a avaliar a qualidade do ovo.

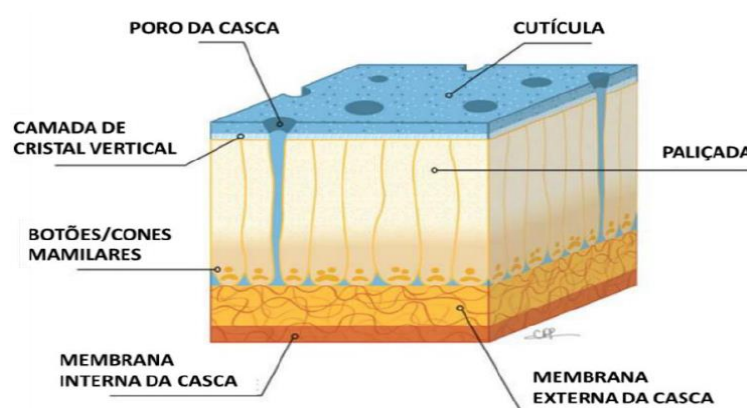


Figura 4. Esquema morfológica da casca do ovo. Adaptada de Hincke et al. (2012).

Quadro 1. Ultraestruturas da casca do ovo

Ultraestrutura	Composição	Espessura (µm)	Função
Membranas interna e externa da casca	Compostas por fibras orgânicas. Colágenos I, V e X (10%), proteínas e glicoproteínas contendo ligações cruzadas de lisina (70-75%).	20 e 50 µm	Importante barreira contra a penetração de microrganismos e possíveis guias para a deposição dos cristais de cálcio %).
Camada mamilar	Partes basais de colunas calcificadas e cones que penetram na membrana externa da casca. Os núcleos orgânicos são constituídos por proteoglicanos queratina-sulfato.	70 µm	Considerados os sítios de implantação de iniciação da deposição dos sais de cálcio, formam os corpos de reserva de cálcio, responsáveis pela dissolução e mobilização de cálcio pelo embrião e formação dos poros e da camada paliçada.
Camada paliçada	Constituída por carbonado de cálcio e uma matriz orgânica (2 a 3%), a camada paliçada é depositada no núcleo, tanto a parte mineral quanto a matriz orgânica.	200 µm	Representa dois terços da espessura total da casca e faz parte do segundo estágio de formação do invólucro. A matriz orgânica é responsável pelo controle da cristalização e ação antimicrobiana.
Camada de cristal vertical	Constituída por cristais curtos e finos com colunas que se apresentam verticalmente orientados. Esta camada é mais densa que a paliçada.	3 a 8 µm	Estrutural
Cutícula	Camada mais externa da casca do ovo. Cobre os canais dos poros no momento da postura e tem a função de impedir a entrada de microrganismos para o interior do ovo, além de proteger contra a perda excessiva de água.	10 a 30 µm	Constituída por aproximadamente por 3% de cinzas, 5% de carboidratos, e cerca de 90% de proteínas e glicoproteínas.

Fontes: Adaptado de Parsons (1982); Arias et al. (1991); Fernandez et al. (1997). Lavelin et al. (2000), Nys et al. (2004); Nys e Gautron (2007); Li-Chan Kim (2008); Hincke et al. (2012).

A qualidade de um ovo incubável pode ser medida pelo tamanho ou peso que ele apresenta. Além de aspectos visuais que também são relevantes. A casca, por exemplo, não pode apresentar defeitos, partes trincadas e ondulações e deve estar limpa o suficiente para chegar à sala de nascimento sem oferecer quaisquer riscos de contaminação (Khabisi et al., 2012).

Uma das formas que se tem para avaliar a qualidade da casca no ambiente de granja é o método da Gravidade ou peso Específico, fundamentado em diferentes concentrações de salinas calibradas com um aparelho densimétrico. Citado por Hempe et al. (1988), Olsson

(1934) foi o primeiro pesquisador a descrever que a técnica apresenta relação direta com o percentual da casca e, desta forma, pode ser utilizado para como método indireto na determinação da qualidade da casca. As soluções variam entre 1.070 a 1.085, com intervalos de 0,005 de acordo com a metodologia descrita por Castelló et al. (1989). Ovos frescos têm praticamente a mesma densidade da água, entretanto, com o passar do tempo, o albúmen desidrata, com redução direta do volume e, desta forma, permite mais espaço para a câmara de ar se expandir, reduzindo a densidade do ovo. Da mesma forma, ovos com baixa qualidade de casca tendem a perder umidade mais rápido e assim, são considerados de qualidade inferior na Gravidade Específica (Araújo e Albino, 2011).

Mais análises estão disponíveis, entretanto, são realizadas em menor frequência nas unidades produtoras de ovos férteis. Como exemplos, análises da porcentagem e espessura da casca, ovoscopia, bem como a resistência da mesma. De acordo Rodriguez-Navarro (2002), a metodologia da resistência da casca é baseada em fraturar a casca do ovo por compressão e medindo a força utilizada no processo por análise mecânica manual ou mecânica digital (EGGTest DET 6500 – Nabel®). Baião e Lúcio (2005), descreveram que entre os métodos diretos, a porcentagem da casca em relação aos pesos do ovo e da casca são importantes para antecipar a incidência de ovos trincados e quebrados.

2. Manejo de coleta dos ovos de ninho e cama

As matrizes, de forma geral, são alojadas em aviários próprios para recria, permanecendo nas instalações do primeiro dia de vida até a transferência, que ocorre em média às 22 semanas de idade para aviários de produção, quando estas já se encontram em idades cronológica e fisiológica, aptas a iniciarem a fase reprodutiva (Klein et al. 2018), inclusive preparadas para receberem estímulos luminosos e maiores volumes de ração.

A simulação do manejo de coletas de ovos tem seu início antes mesmo das aves começarem a postura. Isto se deve pelo tempo necessário para as aves se habituarem com o novo ambiente e serem condicionadas para a entrada no interior dos ninhos (Wilson, 1996).

No pico de produção de ovos, entre 27 a 36 semanas de vida das matrizes, normalmente, ovos são coletados nos ninhos e cama em intervalos de duas horas, com início às 8:00 horas da manhã e a última coleta entre 15:00 e 15:30 horas, com o número total de

coletas entre cinco e seis por dia. Para aqueles ovos depositados na cama a coleta é considerada prioritária, sendo os de ninhos coletados logo em seguida, adotando todos os protocolos de higiene das mãos e utensílios (bandejas e carrinhos). Contudo, de forma geral, ovos de cama são manejados (seleção, limpeza e envio para sanitização), na maioria das vezes, apenas no final de cada coleta de ninho, ou seja, duas horas após a sua retirada da cama. O manejo com ovos de cama após a coleta geralmente é postergado devido ao alto volume de ovos depositados no interior dos ninhos e a real preocupação de realizar a coleta o mais rápido possível, evitando assim, trincas e quebras, bem como a elevação dos índices de contaminação (Sesti, 2005). Desta forma, ovos de cama que seriam considerados aproveitáveis para a incubação podem ficar prejudicados com os atrasos das tarefas, principalmente o tempo para limpeza e sanitização. O descuido do manejo sobre ovos de cama pode transportar altas cargas bacterianas para os nascedouros e, conseqüentemente, resultados negativos de eclodibilidade devido ao aumento da mortalidade embrionária (Buhr et al., 1994).

Após o pico de produção, com o avançar da idade, ocorre de forma natural e gradativa, a redução da produção de ovos pelas matrizes (Rutz et al., 2007). Para compensar a redução da produção de ovos, é comum no gerenciamento da rotina de granjas, a redução do número de pessoas destinadas às coletas e, desta forma, ocorre paralelamente aumento dos intervalos entre as coletas. Assim sendo, o tempo de permanência dos ovos dentro dos ninhos e na cama é maior e, conseqüentemente, aumenta o contato com áreas de maior população microbológica (North, 1972).

3. Classificação de ovos nas granjas

A classificação dos ovos nas granjas é realizada de forma manual (Figura 5). A tarefa é segregar os ovos considerados como incubáveis dos não incubáveis, com início da separação logo após a coleta. Nas unidades de produção os não incubáveis devem ser selecionados e enviados ao incubatório em bandejas separadas, devidamente identificadas. São eles: exageradamente deformados, ovos sujos dormidos (ovos postos na cama durante a noite), quebrados, pequeno ou industrial (de acordo como as regras de cada empresa), ovos grandes, gema dupla, casca fina e ovos contendo apenas a membrana (Cobb-Vantrees Inc.,

2021). De forma geral, ovos não incubáveis são descartados ou direcionados à venda, quando autorizada para a industrialização.

Os ovos classificados como incubáveis são aqueles que apresentam boas qualidades físicas, tamanho adequado, forma, cor, casca limpa, íntegro e ausência de deformidades da casca. Entretanto, ovos de cama coletados durante o dia, com poucas sujidades e que não esfriaram por completo, podem ser coletados e classificados como incubáveis. Desta forma, todos os ovos incubáveis selecionados após a coleta são contabilizados na indústria avícola como aproveitados de granja, ou seja, serão aqueles utilizados para o processo de incubação. A classificação de ovos incubáveis nas granjas de reprodução, de forma geral, segue os padrões internos de cada empresa, de acordo com critérios técnicos e comerciais (Cobb-Vantrees Inc. ,2021).



Figura 5. Na sequência a classificação dos ovos na granja: ovo grande ou duas gemas, pequeno ou industrial, deformado, trincado, sujo ou de cama, apenas com membrana, ovo incubável.

Fonte: arquivo pessoal.

3.1 Ovos de cama e suas características

O número de ovos de cama deve ser o menor possível. No início da produção é comum o maior percentual de ovos de cama. Esta característica é considerada normal até a acomodação das aves nas instalações e condicionamento de entrada no interior dos ninhos (Wilson, 1996).

Ovos de cama são todos aqueles encontrados no momento da coleta no chão do aviário e, geralmente, são classificados como ovos de cama lipos ou sujos, e também quanto a sua temperatura, frios ou quentes. Ovos limpos são aqueles recolhidos logo após a postura que ainda se apresentam com temperatura próxima à da postura, sem nenhuma sujeira, apenas sendo necessário sanitizá-los imediatamente após a coleta. Ovos sujos são aqueles

considerados com sujidades aderidas à casca. Esta categoria deve ser limpa e sanitizada no mesmo padrão de ovos sujos de ninho. Ovos muito sujos, independentemente de estarem frios ou quentes, não devem ser classificados como ovos incubáveis. Araújo e Albino (2011) recomendaram lavar ovos sujos de ninho e de cama após o procedimento de coleta, entretanto, Gole et al. (2014) afirmaram que durante a lavagem dos ovos a cutícula pode ser danificada. De acordo com os autores, esta avaria eleva a penetração de microrganismos para o interior do ovo, com produção de efeito contrário na redução da contaminação.

A relevância dos ovos de cama está diretamente ligada à sua menor eclodibilidade e ônus financeiro para a cadeia produtiva (Van den Brand et al., 2016). As consequências estão associadas no maior grau de contaminação encontrado na superfície da casca. Ovos com casca suja promovem maior mortalidade embrionária em todas as fases da incubação e são mais propensos a produzir maior percentual de pintos com qualidade inferior (Jabbar e Ditta, 2017). Deeming et al. (2002), no estudo do rendimento de incubação apresentaram que ovos de cama de matrizes pesadas têm menores índices de eclodibilidade quando comparados a ovos limpos de ninho. As reduções são decorrentes da maior taxa de contaminação do saco vitelínico de embriões provenientes dos ovos de cama. Os resultados da pesquisa de Cony et al. (2008) corroboram com os resultados citados anteriormente, os quais afirmaram que a microbiota bacteriana existente na superfície da casca pode contaminar e causar mortalidade embrionária. Em pesquisa recente, Ahamed et al. (2019) compararam o rendimento de incubação entre ovos limpos de ninho e ovos de cama. Os autores relataram que ovos limpos de ninho têm maior eclosão que ovos de cama, entretanto, ovos limpos de ninho apresentaram maior mortalidade embrionária inicial (0 a 7 dias) e concluíram que muitos são os fatores que podem elevar a mortalidade precoce do embrião.

É fato que, nas unidades de produção de ovos férteis, em condições normais, aves em pico de produção têm o manejo de coleta e sanitização dos ovos limpos de ninho e cama realizado a cada duas horas e, no terço final da fase reprodutiva, com redução do número de funcionários devido à redução natural da produção de ovos pelas aves, o intervalo entre coletas pode ser expandido. Desta forma, em muitas unidades, ovos de ninho e de cama podem ser coletados em intervalos de até 3 horas. De forma geral, os gestores das unidades de produção buscam adequar estes intervalos, principalmente quando se trata de ovos postos na cama, com implantação de um maior número de coletas para esta categoria de ovo, entretanto, isto pode não ser o suficiente, caso o momento da sanitização seja negligenciado.

Índice de ovos contaminados foi a única variável que sofreu efeito do tipo de ovo.

Demais consequências estão associadas às sujidades aderidas na casca de ovos sujos e de cama. A aderência pode reduzir trocas gasosas e perda de água durante a incubação, com impacto sobre a baixa perda de água do ovo durante o processo de incubação. As consequências diretas são a diminuição do rendimento, peso e desempenho do pinto de um dia, bem como elevação dos níveis de contaminação cruzada no interior das máquinas incubadoras (Jabbar et al. 2017).

3.1.1 Fatores que influenciam a postura na cama

O alto índice de ovos de cama é multifatorial. Isto implica que são necessárias muitas tomadas de decisões e não restringir as ações em apenas um fator. As hipóteses geralmente são centralizadas na gestão e manejo, entretanto, muitas causas podem estar atreladas ao comportamento das aves ao realizar a postura na cama e não nos ninhos (Van den Oever, 2020). Dentre os principais fatores destacam-se a genética, idade da matriz, manejos inadequados no início da fase reprodutiva, densidade de animais por área, desenho das instalações, dimensionamento de ninhos e demais equipamentos, hora de distribuição da ração, programa de luz e ambiência (Jabbar et al., 2017).

3.1.1.1 Genética e comportamento

A genética e o comportamento das aves podem interferir no número de ovos de cama em matrizes pesadas. Van den Oever, (2020), pesquisou cinco linhagens comerciais e observou diferenças sobre o número de ovos de cama. A pesquisa apontou que duas linhagens escolheram ninhos localizados nos cantos da instalação provavelmente devido ao microclima e luminosidade dos ninhos em detrimento aos ninhos centrais, enquanto três linhagens apresentaram distribuição uniforme de escolha. O autor concluiu que as duas linhagens apresentaram prováveis predisposições genéticas ao comportamento de nidificação gregária, ou seja, o instinto de realizar a postura em grupo. Desta forma, nos horários de pico de postura, as aves selecionam e superlotam determinadas bocas de ninhos alocados em específicos espaços do aviário (fundo das instalações ou locais com pouca

luminosidade), o que força as demais galinhas realizarem a postura sobre a cama. Este comportamento, de acordo com Riber (2012), é devido ao instinto de proteção da ave à predação na natureza ou a falta de experiência de aves jovens.

O Comportamento de machos e fêmeas também podem afetar o número de ovos de cama. Galos reprodutores são conhecidos por serem agressivos em período de acasalamento, levando a lesões de pele e perda de pena nas matrizes (de Jong e Guémené, 2011). Portanto, a mera presença dos galos pode reduzir o número de ovos de cama, devido ao provável fato de influenciarem a distribuição espacial das fêmeas no interior dos aviários. Para se protegerem, as matrizes utilizam, de forma mais acentuada, o espaço ripado que a cama do aviário, pois, nesta área, o tempo de permanência dos galos é bem menor. Desta forma, as fêmeas procuram locais mais protegidos em defesa ao comportamento agressivo dos galos (Rietveld-Piepers et al., 1985).

3.1.1.2 Idade da matriz

Matrizes novas, em fase inicial de produção, têm como característica maiores índices de postura na cama do aviário (Martini e Freitas, 2019). Este comportamento pode estar associado ao estresse da transferência para as granjas de produção, quando as matrizes são alojadas em ambientes totalmente inóspitos, diferentes da fase de recria, e expostas pela primeira vez aos ninhos. De forma geral, com o avançar da idade, as aves mais velhas são condicionadas, por instinto e manejo, ao novo ambiente e aos ninhos. Desta forma, o percentual de ovos de cama tende a diminuir. Contudo, torna-se necessário, para a manter a qualidade do ovo incubável no início e todo período de produção, é importante acelerar a postura no interior dos ninhos o quanto antes. Para isso, é essencial alojar as aves em condições ótimas de ambiência e adequar o manejo inicial de coleta e entrada nos ninhos. As vantagens da maior postura de ovos no interior do ninho realizadas pelas matrizes velhas são contrapostas pelos desafios de qualidade do ovo, pois estes estão propensos a maior contaminação, exatamente pela qualidade inferior da casca (Jabbar et al., 2017).

3.1.1.3 Mão-de-obra e manejo

A mão-de-obra capacitada e comprometida é um ponto positivo sobre o percentual de ovos de cama durante a vida do lote de matrizes. Planejar, padronizar e treinar os responsáveis aos manejos da coleta de ovos e condicionamento de entrada das aves nos ninhos, antes mesmo de dar-se início ao maior volume de ovos produzidos, pode reduzir sensivelmente o índice de ovos de cama. O objetivo é condicionar as aves a entrarem nos ninhos o quanto antes. Para isso são necessárias mais coletas de ovos de cama que o manejo convencional adotado para aves mais velhas. A ação dificulta as fêmeas encontrem ovos na cama e, desta forma, inibe o comportamento natural de postura sobre os mesmos (Avila, 2001).

Sobre o mesmo contexto, Hulzebosch (2004) sugeriu que o percentual de ovos de cama deve ser calculado semanalmente e apresentado aos colaboradores por meio de gráficos (gestão à vista). Treinamento insuficiente do corpo operacional pode reduzir o comprometimento e elevar os índices de ovos de cama. Os dados devem ser colhidos, compilados, interpretados e compartilhados o quanto antes. Ações corretivas devem ser adotadas e suas efetividades checadas diariamente no ambiente da granja, assim, evita-se o condicionamento reverso das aves, ou seja, índices de ovos de cama sem controle durante toda a vida produtiva.

Os estudos de Algers e Svedberg (1989) concluíram que a densidade de criação interfere sobre as condições de bem-estar, principalmente por reduzir a qualidade da cama e do ar. Estes fatores são estressantes, pois intensificam o desconforto das aves e número de aves por boca de ninho. Somado a isso, condições inadequadas de ambiência promove o estresse calórico nas aves, estimulando o comportamento das matrizes de evitarem entrar no interior dos ninhos, principalmente no período inicial de adaptação. O quadro pode ser agravado em determinadas épocas do ano, onde as condições ambientais são mais desafiadoras. A sinergia entre alta densidade e a má gestão da ambiência pode elevar o número de ovos contaminados, principalmente pela redução da qualidade da cama (Lara, 2015) em associação ao maior volume de ovos de cama.

A restrição do volume de ração é uma técnica de manejo comumente usada para aumentar a eficiência reprodutiva das matrizes pesadas (Moradi et al., 2013). Entretanto, o baixo volume de ração e o horário de distribuição pode afetar o comportamento das aves no

momento da postura. De forma geral, o manejo do arraçoamento é comumente realizado no mesmo horário fisiológico da oviposição. Neste contexto, é formado o paradoxo da alimentação *versus* postura, ou seja, o desejo da ave se alimentar e realizar a postura ao mesmo tempo. De acordo com os estudos de Sheppard e Ducan (2011), as aves priorizam o ato da alimentação, em função da alimentação restrita, em detrimento à postura do ovo no interior do ninho, desta forma, realizam a postura na cama, sob os equipamentos de distribuição de ração ou nos cantos do aviário.

3.1.1.4 Instalações, ninhos e demais equipamentos

As configurações das instalações e as estruturas e dimensionamento de ninhos automáticos podem influenciar o índice de ovos de cama (Bakker, 2015). Figueiredo et al. (1998) concluíram que o uso de estrado ripado sobre o piso, em comparação ao uso exclusivo de maravalha na cama, não aumentou o número de ovos incubáveis, entretanto, diminuiu perdas decorrentes da postura na cama. Hulzebosch (2006) concluiu que o desenho das instalações, a presença de piso suspenso e a posição dos bebedouros sobre os Slats dos ninhos automáticos têm influência no número de ovos de cama. Somado a isto, a densidade elevada de aves por metro quadrado ou número insuficiente de ninhos aumenta a competição pelas entradas no interior do equipamento, promovendo assim, maior porcentagem de ovos na cama (Martini e Freitas, 2019).

As matrizes preferem ninhos manuais aos ninhos automáticos, o que implica, de forma geral, índices superiores de ovos de cama em equipamentos automáticos (Rovaris et al., 2014). Os autores encontraram as frequências de postura às 35 semanas de idade de 2,53% e 6,82% de ovos de cama em ambientes com ninhos manuais e automáticos, respectivamente. Já com 45 semanas de idade as frequências foram de 2,19% e 6,04% às 45 semanas. Em contrapartida, ninhos automáticos proporcionam maior velocidade de coleta, reduz o contato da ave com o ovo e do ovo com a esteira e o ambiente, o que pode reduzir os índices de ovos sujos, trincados e perdidos (Silva, 2013).

4. Sanitização de ovos incubáveis – Fumigação

Antes de serem incubados, os ovos passam por procedimentos de seleção, limpeza (ovos sujos) e sanitização da casca. O objetivo é reduzir a população de microrganismos que possa comprometer o rendimento de incubação e o desempenho do frango de corte. Os procedimentos de sanitização adotados na indústria avícola são diversos, como exemplo, existem os que são empregados sanitizantes diluídos em água, denominados sanitização úmida (pulverização e imersão), enquanto outros são aplicados em forma de gás, denominados sanitização a seco ou fumigação (Cony et al., 2008).

Várias pesquisas nas décadas de 40 e 50 iniciaram estudos científicos com o objetivo de fomentar procedimentos de sanitização. Lorenz et al. (1950) utilizaram óxido de etileno na fumigação de ovos comerciais para armazenamento. Os pesquisadores aplicaram o uso da molécula, sendo considerada um dos primeiros conceitos de procedimentos de sanitização por fumigação.

Posteriormente, com o avanço das pesquisas, a sanitização de ovos por fumigação com paraformaldeído tornaria o método o mais pesquisado e utilizado. O uso do químico, na forma de gás formaldeído, foi comprovado como agente fumigador por eliminar microrganismos presentes na superfície da casca do ovo. A atividade bactericida e fungicida do paraformaldeído se deve pela sua capacidade de ligar aos grupamentos amida e amino das proteínas dos microrganismos e aos átomos de nitrogênio das bases purinas e pirimidinas do DNA e RNA (Cadirci, 2009).

Atualmente a fumigação é o procedimento mais utilizado no Brasil (Branco, 2017) por sua eficiência e baixo custo e consiste da queima e sublimação da forma de pó do paraformaldeído (91% de formaldeído) em ambientes fechados e controlados, com rigoroso controle do tempo de queima do pó, ação e expurgo do gás (exaustão do gás). Para que a fumigação com paraformaldeído seja eficiente, é necessário considerar o controle rigoroso de fatores físicos como tempo, temperatura e umidade do ar. Araújo e Albino, (2011) afirmaram que estes fatores devem ser padronizados para a maximizar a eficiência da fumigação. De acordo com os autores, a temperatura e umidade do ar, consideradas ideais para a ação eficiente do gás, é entre 25 e 33°C e 75% e 95%, respectivamente. Além disso, é importante respeitar a exposição do material a ser sanitizado em tempo mínimo de 20 minutos.

A técnica é aplicada há anos pelo setor avícola com os objetivos de sanitizar embalagens de ovos, caixas de pintos, máquinas e demais equipamentos destinados a incubação, perante a obrigatoriedade da limpeza previa das superfícies a serem sanitizadas (OIE, 2010). O paraformaldeído é considerado muito eficiente e tem a vantagem de apresentar baixo custo, entretanto, é desestimulado pelos órgãos governamentais, principalmente pelas suas características como agente irritante para olhos, nariz e garganta e possuir propriedades cancerígenas, além disso, possui baixo potencial de descontaminação quando é aplicado em sub dosagem ou ambiente com umidade inferior a 60% e risco de mortalidade embrionária quando em excesso (Cadirci, 2009).

Clímaco et al. (2018) descreveram que ovos limpos de ninho sanitizados com paraformaldeído na forma de fumigação apresentaram menor contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais que demais agentes químicos e físicos utilizados como sanitizantes na avicultura (Ozônio, Luz Ultravioleta, Ácido Peracético e Peróxido de hidrogênio). Na mesma linha de pesquisa, os estudos de Melo et. al (2019) avaliaram as mesmas categorias de sanitizantes e concluíram que apenas radiação luz ultravioleta produziu resultados semelhantes ao paraformaldeído, com redução significativa da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais.

5. Momento da sanitização de ovos incubáveis

Além dos fatores físicos que atuam sobre a eficiência do procedimento de fumigação, o tempo entre o fim da coleta e a sanitização do ovo é fundamental para o resultado final, ou seja, o momento da sanitização após a coleta, visto que à medida que o tempo é postergado, a contaminação da casca aumenta e, conseqüentemente, intensifica a penetração de microrganismos para o interior do ovo, com elevação da contaminação do conteúdo interno e menores chances de ação do procedimento (North (1972). O autor apontou a importância do binômio tempo e multiplicação bacteriana quando quantificou a contaminação bacteriana da casca de ovos incubáveis de acordo com o local de postura e o tempo de exposição, sem sanitização, aos microrganismos. O grau de contaminação, segundo o autor, é dependente da temperatura, umidade e local de postura e a contaminação inicial, considerada baixa, pode multiplicar até dez vezes em apenas 60 minutos.

De acordo com Sesti (2005), menor tempo entre o fim da coleta e a sanitização, de forma adequada, é fundamental para melhor controle da contaminação da casca do ovo. Araújo e Albino (2011), recomendaram a sanitização de ovos férteis no máximo 30 minutos após a postura. Segundo os autores o tempo proposto reduziu a contaminação da casca e a entrada e microrganismos para o seu interior.

Diante do exposto, ovos de cama devem ter prioridades na coleta e celeridade na sanitização. Em grande escala de produção, a presença de ovos sujos e/ou de cama é inevitável, portanto, a atenção particular para o momento da sanitização após a coleta desta categoria de ovo torna-se fundamental para manter em níveis mínimos de contaminação e, portanto, maximizar o aproveitamento dos ovos incubáveis na granja.

6. Vias de contaminação de ovos incubáveis no ambiente de produção

Quando o ovo é contaminado diretamente pela galinha, a via é denominada transmissão vertical ou transovariana (De Reu et al., 2006). A contaminação vertical é caracterizada pela colonização bacteriana através da casca ou do conteúdo do ovo antes da postura, pela contaminação inicial de órgãos e do oviduto da ave (Gantois et al. 2009). Estudo recente de Lee et al. (2019) caracterizaram comunidades microbianas do oviduto de matrizes pesadas e encontraram populações relativamente altas de *Pseudomonas*, as quais, segundo os autores, foram semelhantes às encontradas no albúmen e embriões, o que sugere a transferência da microbiota do oviduto para o embrião através do conteúdo interno do ovo.

Contudo, o maior percentual de contaminação ocorre pela transmissão horizontal. A via é considerada a mais importante e acomete o ovo logo após a postura e contato com o meio externo. As condições desfavoráveis de higiene são diretamente proporcionais à contaminação horizontal, como exemplo, qualidade da cama e limpeza das estruturas, bem como os locais que ocorrem a postura (Board e Tranter, 1995). Em sinergia aos pontos desfavoráveis, microrganismos penetram no ovo por trincas, rachaduras ou através dos poros da casca (Aragon-Alegro et al., 2005). O primeiro contato com microrganismos acontece durante a passagem pela cloaca da galinha, e isso pode ser confirmado pelo isolamento dos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* nos cecos de aves (Wei et al. 2013) e na superfície da casca dos ovos após a postura (Olsen et al. (2017).

O mecanismo de contaminação inicia-se logo após a ave realizar a postura, quando os ovos estão úmidos e quentes, o que os tornam mais propensos à contaminação da casca, principalmente quando postos em ambientes muito sujos, como exemplo, a cama do aviário (Hameed et al., 2014). Logo em seguida, após a oviposição, inicia-se o processo de resfriamento dos ovos, o que proporciona o fluxo natural do ar para o interior do ovo através dos poros presentes na casca. O fenômeno carrega, simultaneamente, microrganismos para o interior (Scott e Swetnam, 1993). North (1984) classifica o nível de contaminação do ovo em limpos, sujos e muito sujos. O escore é definido pela presença de microrganismo na casca, ou seja, ovos limpos entre 3.000 e 5.000, sujos entre 5.000 e 28.000 e muito sujos entre 390.000 e 430.000 microrganismos. Berrang et al. (1999) descreveram que a transmissão horizontal por penetração bacteriana para o interior do ovo via poros da casca pode levar à contaminação interna e do embrião e, desta forma, contaminar outros pintos, principalmente quando os ovos eclodem nos nascedouros dos incubatórios comerciais.

7. Pontos críticos da contaminação de ovos incubáveis

7.1 Fatores extrínsecos

Graves e MacLaury (1962) apontaram a importância de fatores extrínsecos responsáveis pela contaminação do ovo. Os autores concluíram que o aumento da temperatura e umidade do ar favoreceu a contaminação da superfície da casca. Ainda, houve correlação positiva entre o aumento da temperatura e da umidade do ambiente e a contaminação da casca pelas espécies *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus fecalis*. O objetivo dos autores foi apresentar a importância da manutenção do ambiente de produção seco e frio para controlar o desenvolvimento microbiológico. Em estudos sobre contaminação do conteúdo do ovo, Pinto e Silva (2009) indicam que temperaturas altas, acima de 30°C, podem favorecer o desenvolvimento de *Salmonella enteritidis*, inclusive no meio desfavorável como o albúmen, rico em substâncias antimicrobianas.

A presença de água também é um fator importante para a disseminação de microrganismos e contaminação trans-casca (Cook et al., 2003). A água é fundamental para o crescimento bacteriano na casca do ovo, inclusive com função de transportar os

microrganismos do meio externo para interno através dos poros. Somado a isso, a presença de água na superfície da casca pode maximizar o crescimento microbiano e estes podem deteriorar a cutícula da casca e reduzir a proteção dos poros, o que elevam as chances de contaminação do conteúdo interno do ovo por bactérias patógenas (Board e Halls 1973; Board et al. 1979).

A quantidade de microrganismos presentes no ambiente é outro fator a ser considerado quando se trata de contaminação bacteriana, sendo diretamente relacionado com o tempo de exposição da casca do ovo às condições ambientais e, conseqüentemente, à população de microrganismos. Board e Tranter (1995), descreveram que bactérias Gram-positivas têm prevalência na casca dos ovos, sendo que a contaminação é originária basicamente da poeira, cama, solo e excretas das aves. De acordo com os autores, a predominância de Gram-positivo está associada na maior tolerância destas bactérias ao ambiente seco da casca. Messens et al. (2005) e De Reu et al. (2006) descreveram que quanto maior o número de bactérias na superfície da casca dos ovos maior é o risco de penetração dos microrganismos através dos poros, bem como de contaminar o seu interior.

Por fim, o período de armazenamento dos ovos pode influenciar a contagem de bactérias ao longo do tempo. Este fator está fortemente associado às temperaturas e umidade relativa da armazenagem (De Reu et al. 2005).

7.2 Fatores intrínsecos

Board e Tranter (1995) consideraram que as propriedades intrínsecas dos ovos são determinantes para os tipos de bactérias que produzem deterioração dos ovos, principalmente para as que possuem características Gram-negativo. Este grupo de bactérias, segundo os autores, está apto em superar as barreiras naturais de defesa antimicrobiana do ovo e contaminar o conteúdo interno.

Board (1966) relatou que, apesar da prevalência de bactérias Gram-positivas na casca, ovos deteriorados e contaminados podem ter a presença mista de Gram-positivas e Gram-negativas, além destas últimas serem comuns o isolamento no conteúdo interno dos ovos.

O ovo possui importantes agentes quelantes que se ligam aos nutrientes, o que dificulta a utilização por microrganismos invasores, principalmente Gram-negativos. Um dos exemplos mais importante e conhecido é a ovotransferrina, segunda proteína mais abundante do albúmen, possui propriedades de formar quelatos com íons de ferro (Fe^{3+}) e, desta forma, inibir as bactérias a utilizarem deste nutriente necessário para o seu desenvolvimento. A elevação do pH e alteração do potencial de oxirredução também possuem a função de inibir o desenvolvimento bacteriano, quando ocorre esse tipo de alteração a proteína é clivada, liberando domínios funcionais de ação bactericida (Ibrahim et al., (2005). Entretanto, bactérias Gram-negativas possuem resistência natural a estas defesas, sendo bem comum isolá-las em maior concentração no conteúdo do ovo e isso se deve, principalmente, à sua capacidade de resistir aos mecanismos naturais intrínsecos de defesa do ovo (Board e Trander 1995).

8. Microbioma do ovo

Bruce e Johnson (1978) apresentaram que o gênero *Micrococcus* constitui a maior parcela da microbiota dos ovos de galinhas e são sempre identificados com frequência na superfície da casca. Microrganismo pertencente à família Micrococcaceae, podem ter como principais fontes de contaminação da casca a poeira, solo ou excretas (Board e Tranter, 1995). De acordo com os autores, a família tem como característica a vantagem de resistir ao ambiente de baixa umidade da superfície da casca. Contudo, segundo os autores, as famílias Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae e Streptococcaceae também possuem importante papel na formação da microbiota do ovo. Em contrapartida, existe baixa frequência dos gêneros *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Aeromonas* na superfície da casca. Estes microrganismos são caracterizados como Gram-negativos e são encontrados em maior frequência no conteúdo do ovo, o que indica estarem aptos em superar as barreiras naturais de defesa antimicrobiana do ovo (Board e Tranter, 1995).

Entre os gêneros bacterianos mais comumente envolvidos na deterioração do ovo estão *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* e dentre os principais patógenos relacionados estão *Salmonella* e *Escherichia* (Ricke et al., 2001).

8.1 Bactérias mesófilas aeróbicas totais

Bactérias mesófilas compõem o grupo de microrganismos com capacidade de multiplicação em temperaturas entre 10°C e 45°C. São importantes indicadores de contaminação de produtos de origem animal, podendo alcançar altas contagens quando o alimento é acondicionado em temperatura ambiente (Frazier e Westhoff, 2000; Patricio, 2003). Presença destes microrganismos em alimentos podem ser associadas aos processos de tratamento industrial, indicando a qualidade de limpeza e sanitização, temperatura das instalações e armazenagem (Santos e Neto, 2016). O mesmo pode ser associado à produção de ovos incubáveis, com indicações dos quadros atuais de limpeza e desinfecções, bem como da pressão de contaminação do ambiente e dos ovos.

8.2 Enterobactérias

São microrganismos capazes de fermentar a lactose e produzir gás quando incubadas a temperaturas de 44-45°C (Frazier e Westhoff, 2000). Os gêneros *Salmonella* e *Escherichia*, bacillus Gram-negativos, peculiares ao filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, são os principais destaques deste grupo.

Pertencente a mesma família Enterobacteriaceae, família Pseudomonadaceae, *Pseudomonas* spp. são responsáveis pela maior frequência da deterioração de ovos incubáveis e comerciais (Board e Tranter, 1995).

8.3 *Salmonella* spp.

Salmonellas spp. são bactérias entéricas que participam de importantes intoxicações alimentares em humanos, sendo consideradas relevantes agentes de problemas de saúde pública. São bacilos não formadores de esporos, possuem flagelos prerotríquios (distribuídos por toda a célula), com exceção dos sorotipos Pullorum e Galinarum. São anaeróbios facultativos e fermentam a glicose e outros açúcares, além de descarboxilizar aminoácidos, por exemplo, a lisina. Estas análises são importantes para diferenciá-las de alguns biótipos e caracterizar o gênero (Berchieri e Macari, 2000). O gênero é formado por duas espécies,

Salmonella entérica e *Salmonella bongori* (Barrow et al, 2010), com mais de 2500 sorovares já identificados, porém, menos de 100 são responsáveis pelas infecções humanas (CDC, 2021). Por esse fato, uma ferramenta de controle efetivo é a epidemiologia, a qual pode ser usada para compilar ocorrências e conhecer os sorovares circulantes, com chances de associá-los às possíveis fontes de contaminação ou até mesmo a forma de entrada na cadeia, como veículos, pessoas, fômites, animais silvestres ou domésticos, insetos, roedores, alimentos (Wibisono et al., 2020). Como exemplo, estudos recentes de Ferrari et al. (2019) observaram que *Salmonella Typhimurium* têm distribuição cosmopolita, ou seja, é relatada em todos os lugares ou continentes. Os autores concluíram que as aves foram as principais fontes de contaminação deste sorovar em humanos, além disso, os sorovares Derby, Agona, Infantis e Kentucky necessitam de monitorias sistemáticas, visto que estão distribuídos em praticamente todos os lotes de matrizes e regiões importantes de produção de aves pelo mundo.

Agrawl et al. (2005) demonstraram que *Salmonella* spp. pode infectar galinhas em qualquer fase da vida, entretanto, as infecções nas primeiras horas são as mais importantes para efeito epidemiológico. O gênero apresenta boa adaptação ao ambiente de granja, com excelente sobrevivência em amostras de poeira (McWhorter e Chousalkar, 2019). Estes microrganismos podem sobreviver por longos períodos em diversos reservatórios, como o solo, água, cama do aviário (Newell et al., 2010), sendo fontes de contaminação direta da casca do ovo nas granjas de produção (Ricke et al., 2001). Somado a isso, a remoção da cutícula da casca por meio de material abrasivo ou lavagem pode aumentar a contaminação por *Salmonella* spp em 20 a 60% (Wilson, 2017).

Nas aves, infecções por *Salmonella* spp., podem causar doenças agudas e crônicas e são classificadas em forma clínica por três enfermidades, pulorose, agente *Salmonella pullorum*; tifo aviário, agente *Salmonella gallinarum*; infecções paratíficas, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, com importantes prejuízos ao setor avícola (Revolledo, 2008). *Salmonella pullorum* e *gallinarum* são consideradas como hospedeiro-específicas para galinhas, entretanto, existem outras espécies, as quais não são específicas e, mesmo assim, podem colonizar o trato gastrointestinal de diferentes espécies de animais. Como exemplo, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, quando em aves, podem colonizar e persistir no intestino sem apresentar quadros clínico, com potencial de invadir a

corrente sanguínea e infectar diferentes órgãos internos e contaminar ovos e carcaças (Revolledo, 2008).

Salmonella enteritidis é a bactéria mais associada à infecção do ovo e se deve pela sua capacidade efetiva de colonizar o ovário e oviduto de galinhas por um longo período, disseminação e persistência no meio avícola mundial e sua habilidade em penetrar, resistir e multiplicar no interior do ovo (Baron et al., 2016; EFSA 2014 e Thorns, 2000). Outro ponto importante na infecção por *Salmonella enteritidis* é a sua velocidade de penetração nos ovos, a qual é dependente da qualidade da casca, temperatura e tempo de armazenamento e a pressão de contaminação. Segundo Jay (2005) a bactéria pode migrar do albúmen para a gema em um dia de acordo com a temperatura de armazenamento e a pressão de contaminação. O autor conclui que a melhor temperatura de migração foi 30°C, entretanto, esta característica foi inibida até os 14 dias quando a armazenagem do ovo foi em 7°C.

Sobre as identificações em conteúdo de ovos de galinhas específicas para *Salmonella*, sorovar *enteritidis* é a bactéria mais comum em infecções verticais de ovos, isto se deve pela sua alta capacidade de invadir e colonizar ovário e oviduto das galinhas e contaminar o ovo e embrião (Baron et al. 2016), por estar disseminada e ser comumente encontrada em lotes de matrizes pelo mundo (EFSA, 2014) e, principalmente, por possuir a habilidade de penetrar, sobreviver e multiplicar no conteúdo do ovo (Thorns, 2000). A via de infecção horizontal, ou seja, capacidade de penetração da bactéria através do contato do ovo com superfícies contaminadas também é importante. Logo após a postura a cutícula da casca é ainda está úmida, não sendo capaz de selar por completo os poros da casca, o que propicia a penetração de bactérias (Gantois, 2009). Neste contexto, é importante que as superfícies do ambiente de produção sejam adequadas à postura, visualmente limpas. É importante que os ovos reduzam o tempo de contato com superfícies sujas, por exemplo, com a cama do aviário e o intervalo entre a coleta e a sanitização seja o mínimo possível.

Moats (1981), em pesquisa com desafios de inoculados de *Salmonella enteritidis*, microrganismos com características semelhantes às *Pseudomonas* spp. (Gram-negativas), sobre a superfície da casca e o seu potencial de contaminar o interior de ovos comerciais, concluiu que ovos lavados e mantidos em alta temperatura foram mais propensos em isolar a bactéria. A explicação plausível seria que ao lavar os ovos ocorre diminuição da competição pela eliminação de outros microrganismos na casca, favorecendo a permanência e isolamento do inoculado de *Salmonella*.

8.4 *Escherichia coli*

Esta bactéria é um bastonete curto com características Gram negativas e não formadora de esporos. São consideradas anaeróbias facultativas, geralmente móveis devido a presenças de flagelos preritríquios, entretanto possuem cepas imóveis também. Doenças causadas por esta bactéria são chamadas de Colibacilose e reconhecidas mundialmente, as quais são comumente relacionadas com os principais problemas sanitários do setor avícola, com robustos prejuízos econômicos (Ferreira e Knobl, 2009). *Escherichia coli* pode ser comumente encontrada no trato gastrointestinal de aves adultas e pintos de um dia, sendo eliminadas, continuamente, através das excretas no ambiente de produção, tornando a sua distribuição cosmopolita (Ferreira e Knobl, 2009).

A principal via de contaminação das aves é o trato respiratório superior, quando as fimbrias aderem às células ciliadas do epitélio da faringe e traqueia, com invasão de vasos sanguíneos, disseminação nos sacos aéreos e posteriores infecções dos demais órgãos. Em animais jovens, a gravidade do quadro respiratório pode ser mais severa, com o umbigo a fonte principal de contaminação (Malo, 2009). Cepas de *E. coli* podem ser classificadas em patotipos, os quais estão associados com a presença de mecanismos de virulência específicos. APEC é o patotipo envolvido com enfermidades das aves, com diferenciação sorológica a partir de estruturas antigênicas do tipo: capsular K (associado à resistência da bactéria); somático O (ligado à liberação de endotoxinas ou destruição do microrganismo); fimbrial (especificidade e aderências nos tecidos e órgãos). Por fim, o flagelante H (movimentação da estirpe através dos flagelos) (Gyles e Fairbrother, 2010).

A patogenicidade da *Escherichia coli* está intimamente ligada aos fatores inerentes ao hospedeiro, por exemplo, o estado imunitário e lesões primárias no trato respiratório superior, bem como fatores inerentes ao agente, como fatores de adesão ou dose primárias infectante (Pourbakhsh et al., 2000).

Fatores ambientais podem predispor infecções por *Escherichia coli*, principalmente vazios sanitários insuficientes, concentração de amônia, deficiência na ventilação, extremos de temperatura, umidade da cama, alta densidade e a sanitizações ineficientes (Ferreira e Knobl, 2009). Segundo estes mesmo autores, aves acometidas por Colibacilose podem apresentar colisepticemia, peritonite, pneumonia, pleuropneumonia, aerossaculites,

pericardite, celulite, coligranuloma, DRC (Doença Crônica Respiratória), onfalite, salpingites, síndrome da cabeça inchada, panoftalmia osteomielite, ooforite, sinovite, artrite. Somado a isso, ela é responsável por perdas econômicas significativas e está entre as enfermidades mais registradas em inquéritos epidemiológicos de saúde das aves e condenações nas plantas de abatedouro (Barnes et al., 2008; Wang et al., 2010).

Apesar da infecção por *E. coli* acometer aves de qualquer idade, os quadros mais graves acontecem em aves mais jovens. A enfermidade eleva a mortalidade, reduz consumo da ração, eficiência alimentar e ganho de peso, bem como provoca prostração, refugagem e reduz a uniformidade (Campos e Trabulsi, 1999).

8.4.1 Contaminação do saco vitelínico e umbigo (onfalite)

Onfalite é o processo inflamatório do umbigo das aves decorrente da contaminação do ovo pela presença de aves reprodutoras infectadas, contato do ovo com excretas das aves, cama do aviário ou superfícies contaminadas. Desta forma, as bactérias penetram através da superfície da casca do ovo e, conseqüentemente, podem contaminar o embrião. Microrganismos como a *E. coli* podem colonizar o oviduto, contaminando o ovo e o embrião, ou seja, pela via vertical. Outras formas de contaminações ocorrem quando ovos são infectados pela via horizontal, na qual, após a penetração de microrganismo através da casca, o embrião pode ingerir o fluido amniótico a partir do 14º dia de incubação e contrair os microrganismos (Pedroso, 2011). Além disso, bactérias podem ser absorvidas em conjunto com o saco da gema, a partir do saco vitelínico infectado (Deeming, 2005).

A contaminação do saco vitelínico por microrganismos pode causar infecções sistêmicas, que por sua vez podem reduzir a qualidade de pintos neonatos e afetar o desempenho produtivo do frango de corte (Harry, 1957).

Quadros clínicos de onfalite podem contemplar abdômen dilatado, umbigo edemaciado, sugestivo de processo inflamatório. De forma geral, as aves se mostram inapetentes e a mortalidade pode ser elevada durante as primeiras semanas. Além disso, as aves apresentam região abdominal mais escura e, quando necropsiadas, apresentam peritonite e presença anormal de resquícios do saco vitelínico (Back, 2002) (Figura 6).

De acordo com Ferreira e Knöbl (2000), as perdas econômicas por onfalite podem ser elevadas, com efeitos negativos postergados até três semanas após o alojamento. Os autores descreveram que o principal agente envolvido é a *E. coli* e ponderaram que pintos acometidos pela bactéria são eliminados dos lotes por não apresentarem desenvolvimento normal, o que poderia afetar os índices zootécnicos exigidos na produção, além de serem responsáveis pela manutenção de diferentes patógenos (vírus, bactérias, parasitas), pois se tornam susceptíveis a estes agentes e foco de disseminação de várias enfermidades.



Figura 6. Onfalite em pintos de um dia (umbigo infectado) e quadro septicêmico apresentado na necropsia ao sétimo dia (pericardite, Peri hepatite, peritonite).

Fonte: arquivo pessoal.

8.5 *Pseudomonas* spp

São microrganismos Gram-negativos, responsáveis pela deterioração dos ovos durante a incubação, com formação de gases e modificação da coloração do albúmen e gema (Board e Tranter, 1995). Os autores ainda afirmaram que esta bactéria foi isolada com frequência em ovos deteriorados em várias partes do mundo durante o período em que a avicultura se tornou mais tecnificada. Ovos deteriorados (Figura 7) podem ter infecção apenas pelo gênero em questão ou mista, com a presença de outras bactérias Gram-negativas e baixa presença de Gram-positivas. Além da *Pseudomonas*, outros gêneros com os *Alcaligenes*,

Escherichia, *Proteus* e *Aeromonas* (Mayes e Takeballi 1983; Board e Tranter 1995), geralmente são isolados deste tipo de ovo.

Pseudomonas spp. e fungos podem digerir a camada cuticular da casca e afetar as propriedades da casca resistente a água, o que diminui a cobertura sobre os poros e aumenta a contaminação trans casca (Cook et al., 2005).

As bactérias mais comumente isoladas na superfície da casca dos ovos são Gram-positivas. Isto se deve pelo ambiente mais seco, os quais têm propriedade de selecionar esses tipos de microrganismo. Apesar de também encontrar bactérias Gram-negativas, estas estão mais propensas a serem isoladas no interior de ovos deteriorados que na superfície da casca (Board 1966). O autor relatou que bactérias Gram-negativas em ambientes com pouca umidade e limpos dificilmente sobrevivem. Portanto, entender o ovo como um ecossistema único, com vários fatores que afetariam a origem e o desenvolvimento de bactérias Gram-negativas, causadoras da deterioração interna dos ovos, auxiliaria conhecer o processo de contaminação (Board, 1969). Corroborando com esse autor, Board e Tranter (1995) concluíram que a presença de bactérias Gram-negativas dos gêneros *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Aeromonas* na superfície da casca é baixa. Contudo, as Gram-negativas, foram encontradas com maior frequência e quantidades no conteúdo do ovo, o que indica estarem aptas em superar as barreiras naturais de defesa antimicrobiana existentes nos ovos. Desta forma, em condições ótimas de desenvolvimento, como o processo de incubação, elevam-se os índices de deterioração dos ovos.



Figura 7. Ovos contaminados no interior da máquina de incubação e no momento de quebra no embriodiagnóstico, após a eclosão.

Fonte: arquivo pessoal.

Board e Tranter (1995) descreveram as alterações acometidas em ovos contaminados e as características das *Pseudomonas* spp. (atributo metabólico, alterações internas do ovo, tipo de podridão). Tabela 2 apresenta as espécies envolvidas, propriedades metabólicas dos microrganismos e as alterações a partir do processo de deterioração (podridão) dos ovos.

Tabela 2. Alterações ocorridas em ovos contaminados por culturas puras de *Pseudomonas*

Microrganismos	Propriedades metabólicas						Alterações	Tipo de podridão
	1	2	3	4	5	6		
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	+	+	-	(+)	-	-	Gema gelatinosa e de cor âmbar com listras verde-oliva; odor parecido com amêndoa	Verde
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	+	-	+	-	Albúmen verde fluorescente à rosa; gema envolta com material cor creme	Rosa
<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	+	-	Albúmen com pigmentos verdes fluorescentes	Verde fluorescente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+	-	-	Albúmen com pigmentos azuis fluorescentes	Azul fluorescente

* 1. Proteólise; 2. Produção de H₂S; 3. Lecitinase; 4. Pigmento solúvel; 5. Pigmento insolúvel; 6. Negativo em todos esses testes. Parênteses indicam que não existem evidências que indicam deterioração do ovo, mesmo que este microrganismo possui este atributo. Adaptado de Board e Tranter (1995).

9. Microbioma Cecal

As aves possuem dois cecos organizados paralelamente. Eles apresentam forma sacular e estão localizados próximos ao íleo (Maiorka, 2004). O ceco é a porção do trato gastrointestinal com a maior população de microrganismos predominantemente colonizado por bactérias anaeróbicas obrigatórias pertencentes as famílias Clostridiaceae, Fusobacteriaceae, Bacteroidaceae e bactérias microaerófilas facultativas, como o *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Lu et al., 2003 e Pedroso, 2011).

A microbiota intestinal é composta por microrganismos denominados benéficos e nocivos. Este conceito é baseado nas quantidades e na sua natureza de cada microrganismo, o que indica se certa população é benéfica ou maléfica para o hospedeiro (Maiorka, 2004).

Segundo Lorençon et al. (2007), a microbiota intestinal em aves recém eclodidas é menor ou menos diversa, desta forma, concluíram que esta característica pode ser determinante para a o processo inicial da digestão das aves e favorece o desenvolvimento de patógenos.

Na contramão, Pedroso et al. (2005), em pesquisas com técnicas de PCR de intestinos de pintos de um dia, demonstraram que na chegada aos aviários os animais já possuem uma rica e complexa comunidade de bactérias.

9.1 Microrganismos benéficos

A microbiota intestinal é composta por 90% de bactérias facultativas aeróbicas ou anaeróbicas, produtoras de ácido láctico (BAL), sendo as principais *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. e bactérias estritamente anaeróbicas (*Bacterioides* spp., *Fusobacterium* spp. e *Eubacterium* spp.) (Lodi, 2001). Entre as ações benéficas destes microrganismos destacam-se os estímulos à produção de mucinas, responsável por inibir a translocação bacteriana (Mattar et al., 2002), bem como modular funções absorptivas, barreira da mucosa, metabolismo e maturação de células, além de estimularem o sistema de defesa imunológico do hospedeiro (Zocco et al., 2007).

Outra função é a capacidade de atuar como barreira aos microrganismos patogênicos através de exclusões competitivas, ou seja, microrganismo comensais agem no trato gastrointestinal com ações que impedem a colonização por agentes patógenos invasores, com a ocupação dos pontos de ligações das superfícies da mucosa intestinal, competindo por nutrientes e produzindo bacteriocinas (Lan et al., 2005).

Microrganismos como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* e *Streptococcus* são considerados bactérias ácido-láticas (BAL). São microrganismos Gram-negativos, não formadores de esporos, catalase negativo, anaeróbicas facultativas, ácido tolerantes e quando fermentam carboidratos produzem ácido láctico (Kondyli et al., 2012; Wright e Axelsson, 2012).

As BAL são importantes por serem capazes de desempenhar muitas funções benéficas ao hospedeiro, como a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, todas com funções antagonistas aos microrganismos indesejáveis. As

bacteriocinas, de origem proteica, podem representar diferentes atividades bactericidas e ou bacteriostáticas, com propriedades de inibir a colonização de várias bactérias patogênicas no intestino, como exemplo, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogens* (Rushdy e Gomaa, 2013; Settanni et al., 2014; Sharma e Saharan, 2014). Lunedo e Pedroso (2017) relataram a importância da influência da microbiota intestinal sobre a fisiologia dos animais é magnífica, visto que os microrganismos têm o potencial de modular o metabolismo, a imunidade, o desenvolvimento de órgãos e tecidos, bem como deposição de gorduras.

9.2 Microrganismos indesejáveis

De acordo com Loddi (2001), a microbiota intestinal possui apenas 10% de bactérias consideradas patogênicas para o hospedeiro, dentre estas estão em destaque *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp. e *Campylobacter* sp. Muitas infecções entéricas são causadas por bactérias, vírus, protozoários e micotoxinas produzidas por fungos, sendo que as infecções podem inclusive evoluir para infecções sistêmicas (Tamehiro et al., 2009). Geralmente, essas infecções ocorrem devido ao desequilíbrio da microbiota intestinal benéfica, com favorecimento de bactérias patogênicas, com claro prejuízo da qualidade intestinal e da saúde da ave (Maiorka, 2004).

9.2.1 *Clostridium* spp.

Classificadas como bactérias anaeróbicas, Gram-positivas, com ocorrência em pares ou cadeias curtas. Possuem as características de esporulação, as quais são resistentes ao meio ambiente, além disso, são produtoras de toxinas responsáveis por diversos problemas de saúde humana e animal. As espécies de *Clostridium* importantes na avicultura podem levar a alterações no trato gastrointestinal. São eles, *Clostridium colinum*, agente da enterite ulcerativa e *Costridium perfringens* tipo A, responsável pela enterite necrótica (Revolledo, 2009).

Mais comum em galinhas, *Clostridium perfringens* pode afetar as aves com dois a seis meses de idade, em frangos de corte atinge as aves mais cedo, com duas a cinco semanas. Os sinais são de depressão, inapetência e diarreia, podendo levar a morte em casos de fase

aguda. Compõe a microbiota normal das aves, entretanto, diversos fatores podem desencadear a enterite necrótica, por exemplo, alterações na dieta, retirada de aditivos melhoradores de desempenho, coccidioses, qualidade da cama (Revolledo, 2009). Lesões podem ser observadas no intestino delgado, principalmente no jejuno e íleo, porém, podem afetar os cecos (Opengart, 2008).

9.2.2 *Campylobacter* spp.

São bactérias Gram-negativas, microaerófilas (crescem em concentrações baixas de oxigênio), formato em espiral, não produzem esporos e possuem um único flagelo polar. São bactérias comensais que vivem no trato gastrointestinal das aves bem adaptadas ao hospedeiro. São importantes pois estão relacionados à segurança alimentar e saúde pública e são bactérias consideradas resistentes a muitos antibióticos (Zhang, 2008). O microrganismo comum veiculado em humanos e aves é o *Campylobacter jejuni*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, R. K.; SINGH, B. R.; BABU, N.; CHANDRA, M. Novel haemolysins of *Salmonella enterica* spp. enterica serovar Gallinarum. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.43, p.626-630, 2005.
- ALGERS, B.; SVEDBERG, J. Effects of atmospheric ammonia and litter status on broiler health. In: Proceedings 3rd European Symposium Poultry Welfare, 1989. Tours, France, 11–14 June, p. 237–241.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; SOUZA, K. L. O.; SOBRINHO, P. S. C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, n. 3, p. 618-622, 2005.
- ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L. F. T. *Incubação Comercial*. 1. ed. Viçosa - MG: Transworld Research Network, 2011. 171p.
- ARIAS, J. L.; FERNANDEZ, M. S.; DENNIS, J. E. et al. Collagens of the Chicken Eggs hell Membranes, *Connec. Tis. Res.*, v. 26, n. 1-2, p. 37-45, 1991.
- BAKKER, W. Automatização nas Matrizes Pesadas. In: SIMPÓSIO TÉCNICO ACAV, 2014. Balneário Camboriú, SC.
- BAHR J. M.; JOHNSON P. A. Reproduction in poultry. In: Cupps PT (Ed.). *Reproduction in domestic animals*. 3rd ed. New York: Academic Press, 1991. p. 555-575.
- BAIÃO, N. C.; CANÇADO, S. V. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária UFMG*, Belo Horizonte, n. 21, p. 43-59, 1997.
- BAIÃO, N. C.; LÚCIO, C. G. *Nutrição de Matrizes Pesadas*. In: Manejo de Matrizes de Corte. 2005, Campinas: FACTA, Cap.10, p.197–216.
- BACK, A. *Manual de doenças das aves*. Cascavel: Mercolab, 2002. p. 62–78.
- BARBOSA, V. M. et al. Efeitos do momento de transferência dos ovos para o nascedouro e da idade da matriz pesada sobre o rendimento de incubação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 65, n. 6, p. 1823-1830, Dec. 2013.

BARBOSA V. M.; BAIÃO N. C.; MENDES, et al. Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootec.*, Belo Horizonte, v. 64. p.1036–1044. 2012.

BARNES, H. J.; NOLAN, L. K.; VAILLANCOURT, J. Colibacillosis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. *Diseases of poultry*. 12.ed. 2, Iowa: Iowa State University Press, p. 691–738, 2008.

BARON, F.; NAU, F.; GUÉRIN-DUBIARD, C.; BONNASSIE, S.; GAUTIER, M.; ANDREWS, S. C.; JAN, S. Eggwhite versus Salmonella Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*, [S.L.], v. 53, p. 82-93, fev. 2016.

BARON, F.; GAUTIER, M.; BRULE, G. Factors involved in the inhibition of growth of Salmonella enteritidis in liquid egg white. *Journal of Food Protection*, v.60, n.11, p.1318–1323, 1997.

BARROW, P. A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. Salmonella. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, G.; THOEN, C.O. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 14, p 231- 257.

BENITES, C. I.; FURTADO, P. B. S.; SEIBEL, N. F. Características e aspectos nutricionais do ovo. In: SOUZ-SOARES, L. A.; SIEWERDT, F. *Aves e ovos*. Pelotas: UFPEL, 2005. p. 57-64.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.183 –189.

BERRANG, M. E.; Frank, J. F.; Buhr, R. J.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; MAULDIN, J. M. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the eggs reproduction period. *Poultry Sci.*, Res. 6, p. 298–305, 1997.

BERRANG, M. E., Cox, N. A., Frank, J. F et al. Bacterial penetration of the eggs hell and hell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J. Appl. Poult. Sci.*, v.8, p. 499- 504, 1999.

BOARD, R.G. Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *J. Appl. Bact.*, v. 29, n. 2, p. 319-341, 1966.

- BOARD, R. G. Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *J. Appl. Bact.*, v. 29, n. 2, p. 319-341, 1969.
- BOARD, R.G.; HALLS, N.A. The cuticle: a barrier to liquid and particle penetration of the shell of the hen's egg. *Brit. Poultry Sci.* v. 14, p. 69–97, 1973.
- BOARD, R.G.; LOSEBY, S.; MILES, V.R. A note on microbial growth on eggshells. *Brit. Poultry Sci.* v. 20, p. 413–420, 1979.
- BOARD, F. G.; TRANTER, H. S. The microbiology of eggs. In. *Egg Science and Technology*, 4rd edition, ed.: W.J. STADELMAN and O.J. COTTERILL .AVI, WESTPORT, CT, 1995. p. 81-104.
- BRANCO, J. R. O. *Eficiência da luz ultravioleta na desinfecção de ovos férteis de reprodutoras pesadas*. 2017. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília.
- BRUCE, J.; JOHNSON, A. L. The bacterial flora of unhatched eggs. *British Poultry Science*, v. 19, p. 681-689, 1978.
- BUHR, R. J.; MAULDIN, J. S.; BAILEY, J. S.; COX, N. A. Automated spray sanitizing of broiler hatching egg. *J. Appl. Poult. Res*, 3, p. 226–233, 1994.
- BURKE, W. H. Reprodução das aves. In: SWENSON M. J.; REECE W. O.; DUKES. *Fisiologia dos Animais domésticos*. 11ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 38, p. 660-689.
- BUTCHER, G. D.; MILES, R. Infectious Bronchitis and Its Effect on Egg Production and Egg Quality. Ifas Extension. University of Florida, 2019. Disponível em: <<https://edis.ifas.ufl.edu/publication/VM014>>. Acesso em: 15 de mai de 2021.
- CADIRCI. S. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Arch Geflügelk*, v. 73, n. 2, p. 116-123, 2009.
- CAMPOS, J. E. *Avicultura razões, fatos e divergências, Incubação Industrial*. Belo Horizonte MG: FEP-MVZ, 2000, Capítulo 7, p. 203-303.
- CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 87-148.

COSTA, S.; COELHO, P.; COSTA, C.; et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology*, v. 252, p. 40-48, 2008.

CASTELLÓ, J. A. L.; PONTES, M.; GONZÁLEZ, F. F. *Producción de huevos*. 1.ed. Barcelona: Real Escuela de Avicultura, 1989. 367p.

SOROTIPOS E A IMPORTÂNCIA DA SOROTIPAGEM DE SALMONELLA. CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/reportspubs/salmonella-atlas/serotyping-importance.html>>. Acesso em: 05 de maio de 2021.

CLÍMACO, W. L. S.; MELO, E. F.; VAZ, et al. Eggs hell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 53, n. 10, p. 1177–1183, 2018.

COBB-VANTREES. Cobb Hatchery: Management Guide, 2021. Disponível em: <https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/6427713bdc/Hatchery-Guide-Layout-R4-min.pdf>>. Acesso em: 05 de maio de 2021.

COOK, M. I.; BEISSINGER, S. R.; TORANZOS, G. A et al. Trans-shell infection by pathogenic microorganisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proc. R. Soc. Lond. B*. v. 270, p. 2233–2240, 2003.

CONY, H. C.; VIEIRA, S. L.; BERRES, J.; GOMES, H. A.; CONEGLIAN, J. L.; FREITAS, D. M. Técnicas de pulverização e imersão com distintos sanitizantes sobre ovos incubáveis. *Ciência Rural*, v. 38, n. 5, p. 1407–1412, 2008.

CROGUENNEC, T.; NAU, F.; PEZENNEC, S.; BRULE. G. Chromatographichet erogeneity of ovotransferrin from hen egg white. In: *European symposium on the quality of eggs and eggs products*, 8, set., 1999, Bologna, Itália. Anais da Associazione Italiana di Avicoltura Scientifica. Bologna (Itália): Instituto di Zootecnia, set., v.2, p. 47-53, 1999.

DE JONG, I. C.; GUÉMÉNÉ; MAJOR, D. welf are issues in broiler breeders. *World's Poultry Science Journal*, v. 67, p. 73–82, 2011.

DE REU, K., GRIJSPEERDT, K., HEYNDRICKX, M. et al. Bacterial eggs hell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for lay inghens. *Brit. Poult. Sci.*, v.46, n.2, p.149-155, 2005.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRICKX, A.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L.; Eggs shell factors influencing eggs shell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Journal Food Microbiol*, v. 112, p. 253–260, 2006.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRICKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens *Br. Poult. Sci.*, v. 47, p. 163–172, 2011.

DEEMING, D. C. Embryonic development and utilisation of egg components, In: *Avian incubation*, ed. D. C. Deeming. Oxford University Press, Toronto. 2002. p. 43–53.

DEEMING, D.C. Yolk sac, body dimension and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. *British Poultry Sci.* Welton - Lincoln, v. 46, n. 5, p. 560-564, 2005.

DONOGHUE, D. J.; MYERS, K. Imaging residue transfer to egg yolks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.6428-6430, 2000.

EFSA. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the Microbiological risks on washing of Table Eggs. *The EFSA Journal*. v. 269, p. 1- 39, 2005.

FERRARI, R. G.; ROSARIO, D. K. A.; CUNHA-NETO, A.; MANO, S. B.; FIGUEIREDO, E. E. S.; CONTE-JUNIOR, C. A. World wide epidemiology of *Salmonella* serovars in animal-based foods: a meta analysis. *Applied Environment Microbiology*, v. 85, 2019.

FERNANDEZ, M. S.; ARAYA, M.; ARIAS, J. L. Eggs shells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Mat. Bio.*, v. 16, p. 13-20, 1997.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. *Doença das aves*. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO, 2009. p. 457-471.

FIGUEIREDO, E. A. P. Efeito do tipo de alojamento, da inseminação artificial e do genótipo sobre características produtivas em matrizes de frangos de corte. *Embrapa suínos e aves*. p.1-3, 1998.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Microbiología de los alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 2000. 681p.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.J.; van IMMERSEEL, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol Rev*, v. 33, n. 4, p. 718-38, 2009.

GARRY, D. B; MILES, R. Infectious Bronchitis and Its Effect on Egg Production and Egg Quality. Veterinary Medicine-Large Animal Clinical Sciences Department, 1991. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/>

GILBERT, A. B. The female reproductive effort. *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. D. J. Bell and B. M. Freeman (Eds.). London: Academic Press, 1971. v3. p. 1153-1162.

CHOUSALKAR, K. K. Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonellas* strains. *Int. J. Food Microbiol*, n.182–183, P. 18–25, 2014.

GRAVES, R. C.; MACLAURY, D. D. W. The effects of temperature, vapor pressure and absolute humidity on bacterial contamination of shell eggs. *Poult. Sci.*, v. 41, p. 1219-1225, 1962.

GYLES, C L, PRESCOTT, J. F; SONGER, J. G., THOEN, O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, Fourth Ed. Iowa: Black well Publishing, 2010. 265p.

HAMEED, U.; AKRAM, W.; ANJUM, M. S. Effect of *Salmonella* on Hatchability and Fertility in Laying Hen, an Assessment. *Veterinaria*, v. 2, p. 20–23, 2014.

HARRY, E. G. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contaminated with bacteria from the hen. *Vet. Rec.*, v. 69, p. 1433–1439, 1957.

HEMPE, J.K.; LAUXWN, R.C.; SAVAGE, J.E. Rapid determination of egg weight and specific gravity using a computerized data collection system. *Poultry Sci.*, v.67, p.902-907, 1988.

HINCKE, M.T.; NYS, Y.; GAUTRON, J. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Bio.*, v.17, p. 1266-1280, 2012.

HULZEBOSCH, J. Choose the laying nest. International Poultry training centre. The Netherlands. *World Poult.*, v. 20 n. 6, 2004.

HULZEBOSCH, J. How to reduce the number of floor eggs. International Poultry training centre. *World Poult.*, v. 22, n. 1, 2006.

IBRAHIM, H. R.; HARAGUCHI, T.; AOKI, T. Ovotransferrin is a redox-dependent auto processing protein incorporating. *Biochimica et Biophysica Acta*, n. 1760, p. 347-355, 2006.

JABBAR, A.; DITTA, Y. A. Effect of Floor Eggs on Hatchability, Candling, Water Loss, Chick Yield, Chick Weight and Dead in Shell. *Journal World's Poult. Research*, v. 7, n. 4, p. 154–158, 2017.

JABBAR A.; YOUSAF A.; YASIR A. D. Effect of Pre-Warming on Broiler Breeder Eggs Hatchability and Post-Hatch Performance. *Journal of Animal Health and Production*, v. 5, n. 1, p. 1–4, 2017.

JÁCOME, I. M. T. D.; FURTADO, D. A.; LEAL, A. F.; SILVA, J. H. V.; MOURA, J. F. P. Avaliação de índices de conforto térmico de instalações para poedeiras no nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, p. 527- 531, 2007.

Johnson, A. L. *Reproduction in the female*. Sturkie's Avian Physiology. 6 ed. Elsevier Inc., 2015. p. 635-665.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAN, C. A.; PETZ, M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 6397–6403, 2000.

KHABISI M. M.; SALAH, A.; MOUSAVI, S. N. The influence of egg shell crack types on hatchability and chick quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* n. 36, p. 289-295, 2012.

KONDYLI, E.; SVARNAS, C.; SAMELIS, J. O. et al. Chemical composition and microbiological quality of ewe and goat milk of native Greek breeds. *Small Ruminant Research*, v. 103, p. 194-199, 2012.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. *J. Agric. Food Chem.* v. 53, p. 8421-8431, 2005. Leeson, S.; Caston, L. J. Vitamin enrichment of eggs. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 12, p. 24-26, 2003.

LAN, Y., VERSTEGEN, M.W.A., TAMMINGA, S., WILLIAMS, B.A. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poultry Science Journal*. Cambridge, vol. 61, n. 01, p. 95-104, 2005.

LARA, L. J. C. Reprodução nas aves: desafios do manejo e da nutrição. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.39, n. 1, p. 85 – 90, 2015.

LAVELIN, I.; MEIRI N.; PINES, M. New insight in eggs hell formation. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 1014–1017, 2000.

LEWIS P. D.; DANISMAN, R.; GOUS R. M. Photoperiods for broiler breeder females during the laying period. *Poultry Sci.*, v. 89, p. 108–114, 2010.

LI-CHAN, E; KIM, H. O. Structure and chemical composition of eggs. In: Mine Y: *Egg Bioscience and Biotechnology*. Nova jersey: John Wiley, 2008. p. 1–65.

LODDI, M. M. Probióticos e prebióticos na nutrição de aves. *Revista CFMV*, n. 23, p. 51-56, 2001.

LORENÇON, L., NUNES, R. V. N., POZZA, P. C., POZZA, M. S. S., APPELT, M. D., SILVA, W. M. S. Utilização de promotores de crescimento para frangos de corte em rações fareladas e peletizadas. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 29, n. 2, p. 151-158, 2007.

LORENZ, F.W.; STARR, P. B.; BOUTHILET, R. Fumigation of Shell Eggs with Ethylene Oxide. *Poultry Sci.*, v. 29, n. 4, p. 545–547, 1950.

LU, J.; IDRIS, U.; HARMON, B.; HOFACRE, C.; MAURER, J. J.; LEE, M. D. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*. *Athens*, v. 69, n. 11, p. 6816–6824, 2003.

LUNEDO, R.; PEDROSO, A. A. Microbiota intestinal: a microbiota intestinal e seus efeitos sobre a fisiologia da ave. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. *Fisiologia das aves comerciais*. Jaboticabal-SP: Funep/Fapesp/Facta, 2017. cap. 29, p. 1-16.

MACDANIEL, G. R.; ROLAND, D. A.; COLEMAN, M. A. The effect of eggshell quality on hatchability and embryonic mortality. *Poultry Sci.*, Champaign, v. 58, p. 10-13, 1978.

MAIORKA, A. Impacto da saúde intestinal na produtividade avícola. In: *V Simpósio Brasil Sul de Avicultura*. 2004. Anais..., Chapecó. p. 26-41, 2004.

MATTAR, A. F., D. H. TEITELBAUM, R. A. DRONGOWSKI, F. YONGI, C. M. HARMON, AND A. G. CORAN. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a caco-2 cell-culture model. *Pediatric Surgery International*. Ann Arbor, v. 18, n. 7, p. 586-590, 2002.

MCWHORTER, A. R.; CHOUSALKAR K. K. Salmonella on Australian cage egg farms: observations from hatching 1 to end of lay. Observations from hatching to end of lay. *Food Microbiology*. V. 87. P. 50-58. 2019.

MAGALHÃES, A. P. C. *Qualidade de Ovos Comerciais de Acordo com a Integridade da Casca, Tipo de Embalagem e Tempo de Armazenamento*. 2007. 43p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

MALO, A. Vacinas e vacinações. In: REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. *Patologia Aviária*. Barueri, SP: Manole, 2009. 510p.

MÁRCHAL, L.; SIMEONOVÁ, J. The relationship of shortening and strength of eggshell to some egg quality indicators and egg production in hens of different initial laying lines. *Arch. Tierz.*, Dummerstorf, n. 45 v. 3, p. 287-296, 2002.

MARTINI, Y.; FREITAS, E.S. Comparação de índices zootécnicos de matrizes de corte alojadas em diferentes densidades de acordo com a idade reprodutiva. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária*, v. 2, n. 2, 2019.

MELO, E. F.; CLÍMACO W. L. S.; TRIGUINELLI M. V., et al. An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs. *Poult. Sci.*, n.0, p. 1–8, 2019.

MESSENS, W., GRIJSPEERDT, K. e HERMAN. L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *Brit. Poult. Sci.*, 46, 694–700, 2005.

MINE, Y.; KOVACS-NOLAN, J. H. Biologically active hen egg components in human health and disease. *J. Poult. Sci.*, v. 41, p. 1–29, 2004.

MOATS, W.A. Factors affecting bacterial loads on shells of commercially washed eggs. *Poult. Sci.*, v. 60, p. 2084–2090, 1981.

MORADI S.; ZAGHARI, M.; SHIVAZAD, M.; OSFOORI, R.; MARDI, M. The effect of increasing feeding frequency on performance, plasma hormone and metabolites, and hepatic lipid metabolism of broiler breeder hens. *Poult. Sci.*, v. 92, p. 1227–1237, 2013.

NASCIMENTO, V.P.; SALLE, C.T.P. O ovo. In: MACARI, M.; GONZALES, E. *Manejo da incubação*. 2.ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003. p. 34-50.

NEVES, A. C. R. S. Maximização do Fluxo Operacional em Incubatório Comerciais. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 7., e SIMPÓSIO GOIANO DE SUINOCULTURA, 2., - Avesui Centro-Oeste. Goiana Anais eletrônicos... [online]. Goiânia, 2005. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/downphp?tipo=publicações&cod_publicacao=497>. Acesso em: 02 mai 2021.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARAKANE, A.; SPRONG, H.; GIESSEN, J. V. D.; KRUSE, H. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, p.3-15, 2010.

NORTH, M. O. *In Commercial Chicken Production Manual: Maintaning Hatching Egg Quality*. Oceanside, California: The Avi Publishing Company, Inc., 1972. v. 139, p.3-15.

NORTH, M. O. Formation of the egg. In: *Commercial Chicken Production Manual*. Oceanside: The Avi Publishing Company. cap.3, p.27-38, 1984.

NYS, Y.; GAUTRON, J.; GARCIA-RUIZ, J.M. et al. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *C. R. Palevol.*, v. 3, p. 549–562, 2004.

NYS, Y.; GAUTRON, J. Structure and Formation of the Egg shell. In: *Bioactive Egg Compounds*. Reiner Huopalahti, Rosina López-Fandino, Marc Anton, Rüdiger Schade. Springer– Verlag Berlin Heidelberg, 2007. p. 99–102.

OIE. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 6.4. - Hygiene and disease security procedures in poultry breeding flocks and hatcheries. 2016. Disponível em: <https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2016/en_chapitre_biosec_u_poul_production.htm>. Acesso em: 17 de mai de 2021.

OLIVEIRA B. L.; OLIVEIRA, D. D. *Qualidade e tecnologia de ovos*. Lavras: UFLA, 2013. 224p.

OLSEN, R.; KUDIRKIENE, E.; THØFNER I.; PORS, S.; KARLSKOV-MORTENSEN P.; LI, L.; PAPASOLOMONTOS, S.; ANGASTINIOTOU C.; CHRISTENSEN, J. Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poultry Sci.*, v. 96, p. 3901–3911, 2017.

OPENGART, K. Necrotic enteritidis. IN: SAIF, Y. M. *Diseases of Poultry*. Ames: Blacwell, 2008. 12º Ed, cap. 22, p. 872- 879.

ORNELLAS, L.H. *Técnica dietética: seleção e preparo de alimentos*. 7. Ed. São Paulo: Editora Metha, 2001. 330p.

PARSONS, A. H. Structure of the eggshell. *Poultry Science*, v. 61, p. 2013–2021, 1982.

PATRICIO, I. S. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. In: MACARI, M.; GONZALES, E. *Manejo da incubação*, Campinas: FACTA, 2003. p. 163-179.

PEDROSO A. A., MENTEN, J. F. M., LAMBAIS, M. R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 14, p.232–237, 2005.

PEDROSO, A. A. *Microbiota do trato digestório: transição do embrião ao abate*. In: CONFERÊNCIA APINCO FACTA, 2011. Santos. *Anais...* p. 123-130. 2011.

PILOTTO, F. Development and Performance of a Mechanical Egg Collection System Versus the Hand-Operated Dutch Nest. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* vol.17 no.4, 2015.

PINTO, A. T., MENDONÇA, A. D.; SILVA, E. N. Isolated or associated experimental contamination of albumen and egg yolk for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* – influence of temperature and storage time. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.128-134, 2009.

POURBAKHS, S. J.; HORNE, S. M.; GIDDINGS, C. W.; EBERT, J. O.; DOETKOTT, C.; SMITH, M. H.; NOLAN, L. K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Diseases*, v. 44, n. 1, p. 23–33, 2000.

REVOLLEDO, L. *Alternativas para o controle de Salmonella*. SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 9., 2008. Chapecó (SC). *Anais...Chapecó*, p.95–110, 2008.

REVOLLEDO, L. Clostridioses. IN: REVOLLEDO, L., FERREIRA, A. J. P. *Patologia aviária*. Ed. Manole Ltda, Barueri, 2009, cap. 6, p. 62-66.

RIBER, A. B. Gregariousnesting - ananti-predator response in layinghens. *Applied Animal Behaviour Science*, p. 138, 70–78, 2012.

RICKE, S. C.; BIRKHOLD, S. G.; GAST. R. K. Eggsand Egg Products. In: 4 ed. Washington: *American Public Health Association (APHA)*, 2001. p. 473–481.

RIETVELD-PIEPERS, B.; BLOKHUIS, H.J.; WIEPKEMA, P.R. Egg-laying behaviour and nestsite selection of domestic hens kept in small floor-pens. *Applied Animal Behaviour Sci.*, v. 14, p. 75–88, 1985.

RINGGENBERG, N., FRÖHLICH, E. K. F., HARLANDER-MATAUSCHEK, A., TOSCANO, M. J., WÜRBEL, H., ROTH, B. A. Effects of variation in nest curtain design on pre-laying behaviour of domestic hens. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 170, p. 34–43, 2015.

ROBERTS, J. R.; BRACKPOOL, C. E. The ultrastructure of avian egg shells. *Poultry Sci. Review*, v. 5, p. 245– 272, 1994.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. B.; DOMÍNGUEZ-GASCA, N.; MUÑOZ, A.; ORTEGA-HERTES, M. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Sci.*, v. 92, p. 3026 – 3035, 2013.

ROSE, S. P. *Principles of Poultry Science*. 1997. New York: CAB international, 1997. 135p.

ROVARIS E.; CORRÊA, G. S. S.; CORRÊA, A. B.; JUNIOR, J. G. C.; LUNA, U. V.; ASSIS, S. D. Efeito do ninho com coleta manual versus automática na eclosão de ovos incubáveis. *PUBVET*, v. 8, ed. 267, art. 1779, 2014.

RUSHDY, A. A.; GOMAA, E. Z. Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, v. 63, p. 81-90, 2013.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; PAN, E.A. Fisiologia e manejo reprodutivo de aves. In: MACARI, M.; MENDES, A.A. (Ed.). *Manejo de Matrizes de Corte*. Campinas, SP: FACTA, 2005. p. 75-143.

SANTOS NETO, J. P. *Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e Salmonella sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos*. 2016. 54f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal de Educação, Ciência E Tecnologia do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

SESTI, L. A. C. Biosseguridade em granjas de reprodutoras. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. *Manejo de matrizes de corte*. Santos: Facta, 2005. p. 244–317.

SETTANNI, L.; GUARCELLO, R.; GAGLIO, R. et al. Production, stability, gene sequencing and in situ anti-Listeria activity of mundticin KS expressed by three *Enterococcus mundtii* strains. *Food Control*, v. 35: 311-322, 2014.

SCHMIDT, G. S.; FIGUEIREDO, E. A. P.; ÁVILA, V. S. Incubação: Característica dos Ovos Incubados. Artigo Embrapa Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1015933/incubacao-caracteristicas-dos-ovos-incubados>>. Acesso em: 05 de maio de 2021.

SCOTT, T. A.; SWETNAM, C. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs. II. Effectiveness against microorganisms on the egg shell. *Journal Applied Poultry Research*, v.2, p.7-11, 1993.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal Of Microbiology*, v. 2014, p. 1-7, 2014.

SHEPPARD K. C.; DUNCAN K. C.; I. J. H. Feeding motivation on the incidence of floor eggs and extraneously calcified eggs laid by broiler breeder hens. *British Pout. Sci.*, v. 52, n. 1, p. 20–29, 2011.

SILVA, R. L. P. *Ninhos automáticos tecnologia e qualidade na produção de ovos férteis*. Engormix. 2012. Disponível em <<https://pt.engormix.com/avicultura/foruns/ninhos-automaticos-tecnologia-qualidade-t44337/>>. Acesso em 30 de abril de 2021.

SILVA, J. H. V.; FILHO J. J.; SILVA E. L.; RIBEIRO, M. L. G.; FURTADO, D. A. Efeito do bebedouro e da densidade de alojamento no desempenho de frangos de corte em alta temperatura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.9, p.636-641. 2005.

SOLOMON, S. E. The eggshell: strength, structure and function, *Brit. Poult. Sci.*, v. 51, n.1, p. 52-59, 2010.

SOLOMON, S. E. *Egg e Egg Shell Quality*. London: Wolfe Publishing, 1991. 149p.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. *Egg Science and Technology*. Fourth Edition. Food Products Press, Inc., New York, 1994. p. 591p.

STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. *Egg science and technology*. 2 ed. Westport: Avi Publishing Company, 1977. 323p.

TAMEHIRO, C. Y. ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. Infecções entéricas de origem viral. IN: REVOLLEDO, L., FERREIRA, A. J. P. *Patologia Aviária*. Barueri: Ed. Manole Ltda, 2009. cap. 24, p. 245- 257.

TAHAMTANI, F. M.; HINRICHSSEN, L. K.; RIBER, A. B. Laying hens performing gregarious nesting show less pacing behaviour during the pre-laying period. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 202, p. 46–52, 2018.

THORNS, C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, v.19, n. 1, p. 226-239, 2000.

TINÔCO, I. de F. F. Avicultura industrial: Novos conceitos de materiais, concepções e técnicas construtivas disponíveis para galpões avícolas brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.3, p.1–26, 2001.

VAN DEN BRAND, H.; SOSEF, M. P.; LOURENS, A.; van HARN, J. Effects of floor eggs on hatchability and later life performance in broiler chickens. *Poultry Sci.*, v. 95, p. 1025–1032, 2016.

VAN DEN OEVER, A. C. M.; KEMP, B.; RODENBURG, T. B.; van de VEM, L. J. F.; BOLHUIS, J. E. Gregarious nesting in relation to floor eggs in broiler breeders. *The international journal of animal biosciences*, v. 15, ed. 1, p. 01-07, 2020.

VAN DER KLEIN, S. A. S.; B'ED'ECARRATS, G. Y.; ROBINSON, F. E.; ZUIDHOF, M. J. Early photostimulation at the recommended body weight reduced broiler breeder performance. *Poultry Sci.*, v. 97, p. 3736–3745, 2018.

VASCONCELOS, L. A. S. Avaliação da qualidade microbiológica físico-química de ovos comercializados em Manaus, AM. Dissertação (Mestre em Ciência Animal). 2018. 53f. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

WRIGHT V., A.; AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: An Introduction, In: LAHTINEM, S., OUWEGAND, A.C., SAALMINEN, S., and WRIGHT V., A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press, p. 2–14, 2012.

WANG, Y.; TANG, C.; YU, X. H.; XIA, M. Y.; YUE, H. Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. *Avian Pathology*, v.39, n.4, p.297-302, 2010.

WIBISONO, F. M.; WIBISONO, F.J.; EFFENDI, M. H.; PLUMERIASTUTI, H.; HIDAYATULLAH, A. R.; HARTADI, E. B.; SOFIANA, E. D. A Review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance. *Systematic Reviews in Pharmacy*. V. 11, p. 481–486, 2020.

WEI, S.; MORRISON, M.; YU, Z. Bacterial censos of poultry microbiome. *Poult. Sci.*, v. 92, p. 671–683, 2013.

WILSON, P. B. Recent advances in avian egg science: A review. *Poultry Sci.*, v. 96, p. 3747–3754, 2017.

ZHANG, Q. Campylobacteriosis. IN: SAIF, Y. M. *Diseases of Poultry*, 12° Ed, c. 17, 2008. p. 675-690.

ZOCCO, M. A., AINORA, M. E., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. Bacteroides thetaiotaomicron in the gut: molecular aspects of their interaction. *Nacional Library of Medicine*, v. 39, n. 8, p. 707-712, 2007.

CAPÍTULO II – Influência do momento da sanitização de ovos de ninho e de cama sobre a qualidade microbiológica, incubação e desempenho de frangos de corte

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos do momento da sanitização de ovos incubáveis limpos de ninho e ovos de cama de matrizes pesadas de 62 semanas de idade. As variáveis analisadas foram as contagens microbiológicas da superfície da casca e conteúdo do ovo, identificação e frequência da microbiota cecal, parâmetros de incubação, qualidade do pinto de um dia, contagens microbiológicas do saco vitelínico e conteúdo cecal dos pintos de um dia e o desempenho dos frangos até 35 dias. Para todas as análises das variáveis, utilizou-se delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2, sendo ovos limpos de ninho ou de cama e o momento da sanitização, em 30 minutos ou 120 minutos após a coleta, constituindo, portanto, quatro tratamentos. Após a cultura dos microrganismos, colônias morfologicamente diferentes foram selecionadas e enviadas para identificação e frequência a partir do método de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e analisador por tempo de voo (TOF). Sanitar ovos limpos de ninho 30 minutos após a coleta reduziu significativamente a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais e enterobactérias do saco vitelínico, bem como a contagem de bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$). Ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta apresentaram maiores contagens de bactérias mesófilas totais e enterobactérias do saco vitelínico, além da contagem de bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal quando comparado aos outros tratamentos ($P<0,05$). Ovos de cama, independentemente do momento da sanitização, apresentaram maior índice de ovos contaminados durante o processo de incubação ($P<0,05$). Ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta apresentaram maior mortalidade inicial (0 a 7 dias) quando comparado aos outros tratamentos avaliados ($P<0,05$). Ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta apresentaram maior mortalidade inicial (0 a 7) quando comparados aos demais tratamentos ($P<0,05$). Não houve diferenças entre os tratamentos avaliados para fertilidade, percentual médio da eclodibilidade do número total de ovos incubados e eclodibilidade do número de ovos férteis incubados, bem como para os parâmetros de qualidade do pinto de um dia (pintos de segunda, qualidade do umbigo, abdômen volumoso e pintos eliminados) ($P>0,05$). Pintos provenientes de ovos limpos de ninho apresentaram menor viabilidade aos 7 dias de vida que pintos provenientes de ovos de cama ($P<0,05$). Pintos provenientes de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta

apresentaram menor viabilidade e menor índice de eficiência produtiva (IEP) aos 35 dias de idade ($P < 0,05$). Os principais filos identificados nas cascas dos ovos independentemente do tratamento foram *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, enquanto no saco vitelínico e conteúdo cecal de pintos, os filos identificados foram *Firmicutes* e *Proteobacteria*. A família Enterobacteriaceae foi identificada no conteúdo de ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta, bem como nos conteúdos de sacos vitelínicos e conteúdo cecais de todos os tratamentos. O gênero mais prevalente encontrado no saco vitelínico foi *Escherichia*, enquanto no conteúdo cecal o gênero *Enterococcus*. Não foi identificado em nenhum dos tratamentos o gênero *Salmonella* na superfície da casca e conteúdo do ovo, entretanto, o gênero *Pseudomonas* foi identificado no conteúdo dos ovos de cama, independentemente do momento de sanitização.

O estudo demonstrou a importância da sanitização de ovos de cama até 30 minutos após a coleta, com benefícios sobre a contaminação dos ovos e o desempenho do frango de corte que apresentou maior viabilidade e Índice de Eficiência Produtiva aos 35 dias em relação aos ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta.

Palavras-chave: Microbiologia; desinfecção; fumigação, MALDITOF, matriz pesada; ovos contaminados; ovos incubáveis.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the timing of sanitization of hatching clean eggs from nest and floor eggs of 62-week-old heavy breeders. The variables analyzed were the microbiological counts of the shell surface and egg content, identification and frequency of the cecal microbiota, incubation parameters, day-old chick quality, yolk sac microbiological counts and cecal content of day-old chicks and performance of chickens up to 35 days. For all the analysis of the variables, a completely randomized experimental design in a 2x2 factorial scheme was used, with clean nest or bed eggs and the time of sanitization, 30 minutes or two hours after collection, constituting, therefore, four treatments. After culturing the microorganisms, morphologically different colonies were selected and sent for identification and frequency using the matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry (MALDI) and time-of-flight (TOF) analyzer method. Sanitizing clean

nest eggs 30 minutes after collection significantly reduced the count of total aerobic mesophilic bacteria and yolk sac enterobacteria, as well as the count of lactic acid bacteria in the cecal content in relation to the other treatments ($P<0.05$). Sanitized clean nest eggs 30 minutes after collection showed higher initial mortality (0 to 7 days) when compared to the other evaluated treatments ($P<0.05$). There were no differences between the treatments evaluated for fertility, mean percentage of hatchability of the total number of eggs hatched and hatchability of the number of fertile eggs hatched, as well as for the day-old chick quality parameters (second grade chicks, navel quality, voluminous abdomen and eliminated chicks) ($P>0.05$). Sanitized floor eggs two hours after collection had higher initial mortality (0 to 7) when compared to other treatments ($P<0.05$). Chicks from clean nest eggs showed lower viability at 7 days of life than chicks from floor eggs ($P<0.05$). Chicks from floor eggs sanitized two hours after collection showed lower viability and lower productive efficiency index (IEP) at 35 days of age ($P<0.05$). The main phyla identified in eggshells regardless of treatment were *Firmicutes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria*, while in the yolk sac and cecal content of chicks, the phyla identified were *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The *Enterobacteriaceae* family was identified in the contents of sanitized clean nest eggs 30 minutes after collection, as well as in the contents of yolk sac and caecal contents of all treatments. The most prevalent genus found in the yolk sac was *Escherichia*, while in the cecal content the genus *Enterococcus*. The *Salmonella* genus was not identified in any of the treatments on the surface of the shell and egg content, however, the *Pseudomonas* genus was identified in the content of floor eggs, regardless of the time of sanitization. The study demonstrated the importance of sanitizing litter eggs up to 30 minutes after collection, with benefits on egg contamination and the performance of the progeny that showed higher viability and Productive Efficiency Index at 35 days compared to sanitized litter eggs. hours after collection.

Keywords: Microbiology; disinfection; fumigation, MALDITOF, heavy matrix; contaminated eggs; hatching eggs.

INTRODUÇÃO

A qualidade do pinto de um dia é fundamental para a boa lucratividade na produção do frango de corte (Decuypere e Bruggeman, 2007). Essa qualidade é dependente do trabalho realizado na produção do ovo incubável nas granjas de matrizes (Tona et al., 2005), principalmente quando o manejo de ovos de cama é negligenciado sob os aspectos de coleta, limpeza e o momento da sanitização.

Ovos de cama são naturalmente mais sujos e possuem percentual maior de trincas que ovos limpos de ninho e maior número de bactérias na superfície da casca (Berrang et al., 1997; De Reu et al., 2011). Como consequência, ovos de cama são mais propensos a contaminação devida as rachaduras e sujidades na superfície da casca, pela facilidade de penetração de microrganismos (Smeltzer et al., 1979). Deeming et al. (2002) apresentaram evidências que a maior contaminação em ovos de cama pode reduzir a eclodibilidade devido a maior taxa de contaminação encontrada em sacos vitelínicos de embriões mortos durante a incubação. Entretanto, pesquisas do impacto desta categoria de ovo sobre a eclodibilidade, qualidade da progênie e o seu desempenho produtivo ainda são escassos. De acordo com Sheppard e Duncan (2011), lotes de matrizes jovens podem apresentar até 20% de ovos de cama. Os autores concluíram que negligenciar ou não incubar este tipo de ovo pode resultar em perdas consideráveis para os custos de produção.

Ovos de cama, geralmente são negligenciados nas unidades de produção e o manejo inadequado pode atrasar o momento ideal de sanitização. O procedimento de sanitização de ovos incubáveis deve ser realizado no máximo 30 minutos após a postura, já que o intervalo adequado entre a postura e a sanitização pode diminuir a carga microbiana da superfície da casca reduzindo a contaminação interna dos ovos (Araújo e Albino 2011).

Objetivou-se investigar os efeitos do momento da sanitização de ovos limpos de ninho e ovos de cama utilizando 3 gramas de paraformaldeído por metro cúbico sobre a contagem microbiana da superfície da casca, conteúdo do ovo, saco vitelínico e conteúdo cecal, bem como o rendimento de incubação, qualidade do pinto de um dia e desempenho dos frangos de corte até 35 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as práticas relativas ao manejo animal foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob o número do protocolo 39/2020.

- Coleta de materiais para análises microbiológicas das superfícies de ninho, esteira de ovos e da cama

Para a caracterização microbiológica do ambiente de criação das aves foram realizados esfregaços de 10 suabes das principais superfícies da granja, sendo utilizados dois suabes na superfície do interior dos ninhos, seis na esteira de coleta de ovos, sendo dois no terço inicial, dois ao centro e dois no terço final da esteira e, por fim, dois na cama

Para isso, foram realizados esfregaços com suabes estéreis sobre as respectivas superfícies e utilizando um artefato de papelão em forma de quadrado com medida padrão (área de esfregaço dos suabes) de 100 centímetros quadrados (10 cm x 10 cm). Após a coleta, os suabes foram armazenados em solução salina fosfato tamponada (PBS) a 0,1% estéril, refrigerados e enviados, logo após as coletas ao laboratório para as análises no mesmo dia.

- Coleta e incubação dos ovos de matrizes pesadas

Na granja de matrizes foram coletados 3.344 ovos, sendo metade de cama e metade de ovos limpos de ninho. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2x2 sendo dois tipos de ovos (ovo limpo de ninho ou ovo de cama) e dois momentos de sanitização (30 minutos após a coleta ou 120 minutos após a coleta), perfazendo quatro tratamentos.

As coletas dos ovos foram realizadas em um lote de matrizes às 62 semanas de idade, da linhagem COBB 500[®]. Ovos limpos de ninho, após serem organizados e identificados de acordo com os tratamentos, foram alocados em bandejas plásticas de incubação no momento da coleta e acomodados em carrinhos de transporte com capacidade para 36 bandejas e 76 ovos cada. Ovos de ninho foram considerados aqueles ovos coletados nos ninhos automáticos e classificados como limpos.

Os ovos de cama, da mesma forma, após serem selecionados, organizados e identificados de acordo com os tratamentos foram alocados em bandejas plásticas de

incubação e acomodados aos carrinhos de transporte na mesma proporção dos ovos limpos de ninho. Foram considerados ovos de cama aqueles encontrados sobre a cama do aviário, os quais foram separados de acordo com o manejo padrão da unidade de produção de ovos incubáveis, podendo ser: sujos de excreta, sujos de cama ou com quaisquer outras sujidades presentes na casca. Para os ovos de cama considerados incubados, os ovos foram manejados para a retirada das sujidades utilizando um estilete, sendo que o ovo de cama sanitizado 30 minutos após a coleta foi limpo imediatamente após a sua retirada da cama e o ovo sanitizado 120 minutos após a coleta manejado apenas no momento de sua sanitização, ou seja, próximo de duas horas após a coleta, semelhante ao manejo real das granjas comerciais.

Foram selecionados para os tratamentos ovos de cinco coletas de cada aviário do núcleo, sendo três coletas pela manhã e duas no período da tarde. Os horários das coletas foram padronizados com intervalo entre coletas de uma hora. A primeira coleta foi realizada 7:30 da manhã, logo após a retirada dos ovos amanhecidos de ninho e de cama, os quais não participaram do experimento. A última coleta foi realizada 15:00 horas. Para cada coleta realizada, os ovos foram acomodados em cada bandeja por tratamento e proporcional ao número de ovos de cada coleta por aviário até completar os 76 por bandeja, de forma a garantir a homogeneidade das amostras, em respeito a cada tipo de ovo (ninho ou cama).

Os carrinhos de transporte com capacidade para 36 bandejas cada foram depositados, na sequência de cada coleta, na câmara de fumigação da sala de ovos do núcleo e submetidos à sanitização com paraformaldeído de acordo com o tipo de ovo e os momentos preconizados. O compartimento de fumigação possui volume de 15,3 m³ e as sanitizações foram realizadas de acordo com os tratamentos predefinidos. A concentração do sanitizante utilizada para a fumigação foi de 3,0 gramas/m³, perfazendo um total de 46 gramas. O período de fumigação foi padronizado em 25 minutos para a queima e ação do agente químico, seguido por 20 minutos correspondente à exaustão antes da abertura da câmara. Essa configuração assegurou que o gás circulasse por todo o compartimento por um tempo considerado ótimo para a ação do agente. A temperatura e a umidade relativa na câmara de fumigação ficaram entre 24,5°C a 26°C e 75% a 90%, respectivamente. Para o controle automático da temperatura e umidade foi utilizado o painel de automação Casp[®] interligado a um umidificador Mondial NUA-02 de ambiente em uma faixa ótima de ação do paraformaldeído (75 a 90% de UR). Após todos os procedimentos de seleção, limpeza e sanitização os ovos foram armazenados na sala de ovos do núcleo permanecendo até o dia posterior em temperatura de 21° Celsius.

No dia seguinte à coleta e fumigação, os ovos do experimento foram transportados para o incubatório comercial. Na planta de incubação foram selecionados e retirados aqueles considerados não incubáveis (trincados, deformados e pequenos) e realizado o manejo de ovoscopia para posicionamento correto dos ovos nas bandejas, ou seja, os ovos foram conferidos e ajustados para que sua ponta fina permanecesse posicionada para baixo. Em seguida, os ovos foram acondicionados na sala de ovos por dois dias consecutivos em temperatura de 21° C até o início do manejo de incubação, os ovos foram distribuídos de acordo com o tratamento em 44 bandejas de incubação com capacidade para 76 ovos cada, totalizando, portanto, 836 ovos por tratamento. Antes da entrada na incubadora, os ovos foram submetidos aos procedimentos de pré-incubação, que consiste em manter os ovos em uma temperatura ambiente de 26° C por doze horas antes da entrada nas máquinas de incubação. O objetivo deste manejo é reduzir a condensação de água na superfície da casca dos ovos e assim reduzir a contaminação dos ovos. As bandejas do experimento foram alocadas em uma máquina de incubação (CASP® CMF 125E, Amparo, São Paulo, Brasil) de estágio múltiplo com capacidade de 124.476 ovos. Diariamente todos os parâmetros de ambiência no interior da máquina foram monitorados. A incubadora foi regulada para a manutenção da temperatura de 99,4° F (37,4° C) em bulbo seco e 82° F (27,7° C) em bulbo úmido, correspondendo a uma umidade de 60%. Todas as bandejas foram distribuídas no interior da incubadora de forma aleatória de acordo com sorteio prévio à incubação.

Aos 18 de incubação os ovos do experimento que apresentaram desenvolvimento embrionário foram transferidos para bandejas específicas de nascimento e mantidas em um único carrinho e prontamente encaminhadas para a máquina de nascimento com capacidade de 20.736 ovos (CASP® 21E, Amparo, São Paulo, Brasil). As bandejas foram distribuídas ao acaso nos espaços do carrinho de acordo com sorteio prévio. A automação manteve a temperatura da máquina entre 98,0°F (36,6° C) e 96,7°F (36° C) e umidade relativa do ar entre 78% e 83% de acordo com a padronização do incubatório. Esta variação de temperatura e umidade relativa é dependente da progressão do processo de eclosão dos ovos.

O embriodiagnóstico foi realizado em três momentos durante a incubação: aos 12 dias de incubação; durante a transferência com 18 dias e no final da incubação. Nos dois primeiros momentos foi realizada ovoscopia para a retirada de ovos inférteis e embriões mortos. Por fim, após o término da incubação, todos os ovos não eclodidos das 11 bandejas de cada tratamento foram avaliados e o número de pintos eclodidos foi contabilizado, obtendo o percentual de eclosão total e eclodibilidade sobre ovos férteis em relação aos 836

ovos incubados para cada tratamento. Ovos não eclodidos foram quebrados e o seu conteúdo investigado para determinação da fase embrionária e a causa da morte do embrião. Foram consideradas três fases de mortalidade embrionária: fase inicial: período de um a sete dias de desenvolvimento; fase intermediária: período de oito a quatorze dias de desenvolvimento e fase final: período de quinze a 21 dias. Além disso, foram contabilizados os índices de ovos inférteis, pintos eliminados, ovos bicados contendo pintos vivos, ovos bicados contendo pintos mortos e ovos com indícios de contaminação bacteriana ou fúngica.

A incubação foi encerrada quando completou 504 horas (21 dias). Logo após, os pintos neonatos foram separadas de acordo com os tratamentos e mantidos em caixa de pintos na sala de expedição em temperatura ambiente de 24°C. As aves foram contadas, selecionadas e separados por tratamento com 100 aves por caixa. Logo após, foram vacinados por via subcutânea contra as doenças de Marek, New Castle e Gumboro, entretanto, sem a aplicação de quaisquer antibióticos.

- Coleta dos ovos para análises microbiológicas antes dos tratamentos (avaliar o quadro microbiológico da granja)

As análises microbiológicas da casca antes dos tratamentos foram realizadas para ilustrar o quadro sanitário e, desta forma, a caracterização e pressão microbiológica no atual momento da experimentação (anexo 1). Para as coletas, foram utilizadas luvas estéreis, e em seguida foram coletados 32 ovos de cama, de forma aleatória, em diferentes pontos dos quatro aviários e 32 ovos limpos de ninho de suas esteiras de coleta de ovos, no total de 64 ovos. Os 32 ovos de cama e limpos de ninho foram subdivididos em dois grupos de 16 ovos cada, sendo um grupo levado para o resfriamento em geladeira a 7°C por 30 minutos após a coleta e mais 16 ovos para o resfriamento 120 minutos após a coleta. Por fim, os 16 ovos foram acondicionados em quatro sacos plásticos estéreis (Whirl-pak), em um *pool* de quatro ovos por saco, no total de quatro repetições por tratamento. Foram realizadas duas coletas idênticas de ovos, sendo a primeira utilizada para as análises microbiológicas da superfície da casca e a outra para análises do conteúdo do ovo, portanto um total final de 128 ovos. Todos os ovos coletados foram postos sob refrigeração a 4°C e transportados até o laboratório para realização das análises microbiológicas.

- Coleta dos ovos para análises microbiológicas dos tratamentos

Para as análises microbiológicas da superfície da casca e conteúdo do ovo após a sanitização mais 32 ovos limpos de ninho e 32 ovos de cama foram coletados, sendo de forma idêntica aos procedimentos realizados na coleta antes da sanitização, ou seja, logo após coleta, os ovos foram divididos em dois grupos de 16 ovos e subdivididos em quatro repetições. A coleta foi realizada com luvas e os ovos colocados em sacos plásticos estéreis (Whirl-pak) em *pool* de quatro ovos por saco, identificados, conforme o tratamento. Foram realizadas duas coletas idênticas de ovos, sendo a primeira utilizada para as análises microbiológicas da superfície da casca e a outra para análises do conteúdo do ovo, perfazendo um total de 128 ovos. Todos os ovos coletados foram postos sob refrigeração a 4°C e transportados até o laboratório para realização das análises microbiológicas.

- Análises microbiológicas da casca do ovo antes e após sanitização

Para as análises, cada saco contendo o *pool* de quatro ovos foi reaberto em ambiente estéril e adicionados 250 mL de solução salina fosfato tamponada (PBS) a 0,1% estéril. O saco foi fechado e os ovos massageados por cinco minutos para remover as células bacterianas da superfície das cascas dos ovos e 1,0 mL da solução enxágue foi diluída em série usando PBS, sendo considerada a diluição 10^{-1} . As amostras diluídas foram plaqueadas em PCA (Oxoid LTDA, Basindstone, Hampshire, Inglaterra) até a diluição 10^{-2} (duas placas) para ovos limpos de ninho e 10^{-3} (três placas) para ovos de cama e utilizadas para contagem total de microrganismos mesófilos aeróbicos, MacConkey (BD Difcotm™, Sparks, Maryland, EUA) até a diluição 10^{-2} (duas placas) para contagem de Enterobactérias e Ágar batata Dextrose (BDA) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) até a diluição 10^{-4} (quatro placas) para contagem de fungos e leveduras. Todas as placas exceto BDA foram incubadas a 37°C por 48 horas antes da contagem das colônias. O BDA foi incubado em temperatura ambiente por sete dias. Na sequência as colônias encontradas foram enumeradas, registradas e calculados em $\log_{10}$ UFC/*poll* de quatro ovos.

- Análises microbiológicas do conteúdo do ovo antes e após sanitização

No Laboratório de Microbiologia de Produtos de Origem Animal, o conteúdo (gema/albúmen) foi coletado com pipetas individuais de 10 e 20 mL, previamente esterilizadas em autoclave, seguido de UV. Logo, foi realizado o pré-enriquecimento das amostras, com adição de BHI na proporção de nove vezes o peso do conteúdo, para posterior

incubação em frascos de vidro a $37^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 24 horas. Após o pré-enriquecimento as amostras foram divididas em duas alíquotas.

A primeira alíquota foi utilizada para isolamento de *Salmonella* sp. e submetida ao enriquecimento seletivo em Caldo Selenito e Caldo Rappaport Vassiliadis. Para isso, foram transferidos de cultura pré-enriquecida (salina tamponada peptonada a 1,0%) por 24 horas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ para os dois caldos seletivos em tubos de ensaio contendo Caldo Rappaport Vassiliadis (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) e para tubos de ensaio contendo Caldo Selenito Cistina (Himédia M025, Mumba, Índia). As amostras foram incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação nos caldos seletivos, o passo seguinte foi o isolamento e caracterização das colônias. Para esta finalidade, foram semeadas em placas de petri, contendo três meios: Brilliant Green Agar (BPLS) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil); Hektoen Enteric (HE) (Oxoid Oxoid LTD., Basingstone, Hampshire, Inglaterra) e Xilose Lisina Desoxicolato (X.L.D), sendo um total de 16 placas para cada meio, divididas ao centro e semeadas metade com Caldo Rappaport e metade Caldo Selenito. As placas foram incubadas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ por 48 horas. Por fim, para as placas com os meios seletivos que apresentaram crescimento após a incubação foram selecionadas colônias típicas e atípicas para identificação por técnica molecular de análise proteômica (MALDI-TOF). Para a triagem inicial foram consideradas identificações das colônias de *Salmonella* em ágar BPLS que apresentarem incolores ou de cor rosada, entre translúcidas ou ligeiramente opacas e, quando rodeadas de microrganismos fermentadores de lactose, poderão apresentar-se de cor verde-amarelada. Em ágar Hektoen, devem se apresentarem em cores verde ou verde azulada, revelando ou não a produção de ácido sulfídrico (H_2S) com a formação, no centro da colônia, de coloração escura. Por fim, a coloração para o crescimento de *Salmonella* em ágar X.L.D devem apresentar colônias vermelhas com centros pretos.

A segunda alíquota advinda do BHI, considerada diluição 10^{-1} , foi utilizada para a contagem e caracterização de Enterobacteriaceae, fungos e leveduras. Foram realizados plaqueamentos em ágar MacConkey (BD Difcotm™, Sparks, Maryland, EUA) e (BDA) (Kasvi, Curitiba, Paraná, Brasil) em diluições centesimais até 10^{-2} (duas placas) e 10^{-4} (quatro placas), respectivamente, seguido o mesmo padrão de incubação e leitura. As colônias selecionadas em Mac Conkey foram enviadas para identificação na técnica de MALDI-TOF.

- Análises microbiológicas do saco vitelínico

As análises microbiológicas do saco vitelínico dos pintos neonatos foram realizadas com a metodologia adaptada de Sander e Wilson (1999). Após 24 horas da eclosão os 12 pintos selecionados por tratamento, totalizando 48 pintos, foram pesados e posteriormente eutanasiados por descolamento cervical para coleta do saco vitelínico em ambiente controlado. Em seguida, o saco vitelínico coletado, pesado e na sequência coletado quantidade suficiente do conteúdo do saco vitelínico de cada pinto e aplicada diluição calculada de acordo com a gramatura colhida e seriada em salina tamponada na diluição 10^{-1} . Logo em seguida, 100 μ L da alíquota foram semeados em PCA (Oxoid LTDA, Basindstone, Hampshire, Inglaterra) para a contagem de bactérias aeróbicas totais e MacConkey (BD DifcotmTM, Sparks, Maryland, EUA) para contagem de Enterobacteriaceae, sendo as diluições centesimais padrões, a partir da diluição 10^{-1} , em duas placas (10^{-1} ; 10^{-2}) e três placas (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}), respectivamente. As placas foram incubadas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C por 48 horas e, logo após, realizada a contagem. Após contar, as colônias foram enumeradas e registradas em $\log_{10}$ UFC/mL. Por fim, colônias foram selecionadas nos dois meios de cultura e enviadas para identificação na técnica de MALDI-TOF.

- Contagem e caracterização da microbiota cecal

Para a contagem e caracterização da microbiota dos cecos, as análises foram realizadas com o conteúdo cecal dos 12 pintos por tratamento utilizados nas análises microbiológicas do saco vitelínico. Após a eutanásia foram retirados os cecos sobre chama e parte do conteúdo luminal do ceco de cada ave foi recuperado em condições assépticas em um tubo vazio pré-pesado. Em seguida, o tubo foi pesado novamente para determinar o peso da amostra recolhida. Em função deste peso, foi introduzido um volume de solução salina tamponada estéril permitindo uma diluição de 10^{-1} . Em seguida, diluições centesimais até 10^{-7} foram preparadas com salina tamponada a partir da diluição 10^{-1} . Cada diluição foi utilizada para semear sete placas de Petri por tratamento contendo ágar de Man, Rogosa e Sharp (MRS, Acumedia) para avaliação de *Lactobacillus*. Em sequência, diluições de até 10^{-3} foram utilizadas para semear três placas por tratamento no ágar MacConkey (Acumedia) para contagem de Enterobacteriaceae. Após espalhar os diversos inóculos, as placas foram incubadas durante 48 horas a $37^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C. Posteriormente, amostras com morfologias diferentes foram enviadas para identificação proteômica.

As identificações e classificações das bactérias após o cultivo foram realizadas através de análise proteômica (MALDI-TOF). Foram selecionados todos os morfotipos das colônias e as placas selecionadas foram enviadas para o Laboratório Aquacen/UFMG. As colônias selecionadas foram transferidas para placas alvo de aço inoxidável, subsequentemente, em cada amostra foi adicionada 1 µL de ácido fórmico a 70% e em seguida 1 µL de solução matriz. A seguir, foram inseridas no espectrômetro (Bruker) para aquisição do espectro. As análises foram realizadas em espectrômetro de massa, onde os compostos químicos são ionizados em moléculas carregadas e a sua relação massa-carga (m/z) foi mensurada. Os espectros de massa compostos gerados foram comparados com os espectros-padrão de amostras de micro-organismos contidas em bases de dados de referência (Aebersold e Mann, 2003). Foi utilizada uma amostra padrão como controle, previamente indicada pelo fabricante. Assim, foi possível determinar o índice de diversidade das bactérias, com o critério se haveria ou não um maior número de bactérias de acordo com os tratamentos.

- Desempenho do frango de corte

A avaliação de desempenho do frango de corte, considerada a segunda parte do experimento, foram selecionados e sexados um total de 312 pintos machos provenientes de ovos das matrizes do experimento, machos da linhagem Cobb[®], sem defeitos de perna, bico, empenamento ou quaisquer anomalias e transportadas para a sala experimental do Laboratório de Metabolismo Animal (LAMA-UFMG) na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental em um arranjo fatorial 2x2, compreendendo dois tipos de ovos (ovos limpos de ninho ou ovo de cama) e dois momentos de sanitização (30 minutos ou 2 horas após a coleta), totalizando quatro tratamentos com seis repetições de 13 aves cada. Os pintos foram alojados em gaiolas metálicas com a densidade de 13 aves/m², em sala climatizada com sistema de circulação de ar, temperatura e umidade relativa do ar controlados. Durante os primeiros quatro dias de alojamento foi utilizado um bebedouro tipo copo de pressão para cada gaiola, posteriormente, um bebedouro *Nipple* automático para cada compartimento, sendo que este último permaneceu até o período final da produção. Do alojamento ao final do experimento as aves ficaram com água e ração à vontade, formuladas para atender todas as fases de produção de acordo com Manual da Cobb (2018), sendo distribuída diariamente, nos primeiros sete dias, em comedouros infantis e após, em comedouro tipo calha, até o final do

experimento. O programa de luz estipulado foi de 16 horas de luz e 8 horas de escuro durante todo o período de criação. As leituras de temperatura e umidade, máximas e mínimas, foram registradas diariamente com o uso de um termômetro digital convencional.

Foram analisadas o peso das aves, consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar, mortalidade, viabilidade e índice de eficiência produtiva (IEP).

As aves foram pesadas com 1 (um), 7 (sete), 21 (vinte e um), 28 (vinte e oito) e 35 (trinta e cinco) dias de idade.

O ganho de peso foi calculado descontando-se o peso inicial dos pintos ao alojamento do peso aferido ao final de cada fase de produção. A quantidade de ração ofertada e as sobras de casa repetição foram pesadas semanalmente para a determinação do consumo de ração e conversão alimentar. O cálculo de conversão alimentar dos frangos foi feito pela relação do consumo médio de ração pelo ganho médio de peso das aves em cada semana de vida completada e no final do experimento, aos 35 dias de vida do frango. O número de aves mortas foi registrado diariamente e foi feito o cálculo da porcentagem de mortalidade e, a partir dessa taxa, calculada a porcentagem de viabilidade (100 menos a porcentagem de mortalidade). O IEP (Índice de eficiência produtiva) foi calculado com o uso da fórmula: $IEP = (GMD \times V \times 100) / CA$, onde, GMD é o ganho médio diário, V a viabilidade, CA, conversão alimentar.

- Análise Estatística

Todas as médias foram comparadas através do procedimento ANOVA e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, além de serem analisadas quando a sua normalidade com a aplicação do teste Shapiro-Wilk (5%). Respostas qualitativas ou quando os dados que violaram o princípio da normalidade, os mesmos foram analisados através de estatística não paramétrica e as médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis (5%). Todas as análises foram realizadas com o uso do software R (2014).

RESULTADOS

Tabela 1. Microbiologia da superfície da superfície da casca e conteúdo dos ovos de cama ou ninho sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta

Tipo de ovo	BMT (UFC/ml)	ENTER (UFC/ml) *	ENTERC (UFC/ml) *	F/LEV (UFC/ml) *	F/LEVC (UFC/ml) *
Ninho	3,65	2,00	2,39	2,00	2,10
Cama	3,38	2,39	2,03	2,11	2,08
Momento da sanitização					
30 minutos	3,35	2,39	2,39	2,03	2,14
2 horas	3,69	2,00	2,03	2,08	2,04
Valor de P					
Tipo de ovo	0,7186	0,3371	0,3850	0,0731	0,7819
Sanitização	0,6628	0,3371	0,3850	0,5250	0,2435
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,0839	0,3370	0,2973	0,5250	0,2453
Erro padrão da média	0,7569	0,3555	0,3240	0,0457	0,0564
CV (%)	41,76	36,16	36,01	5,57	2

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste de Tukey (5%).

BMT = contagem de bactérias mesófilas totais da superfície da casca do ovo; ENTER = contagem de enterobactérias da superfície da casca do ovo; ENTERC = contagem de enterobactérias do conteúdo do ovo; F/LEV = contagem de fungos e leveduras da superfície da casca do ovo; F/LEVC = contagem de fungos e leveduras do conteúdo do ovo.

CV = Coeficiente de variação

Não houve interação entre os tratamentos para as variáveis da análise microbiológica do ovo ($P>0,05$). O tipo de ovo e o momento da sanitização não foram capazes de influenciarem as contagens de bactérias mesófilas aeróbias totais, enterobactérias, fungos e leveduras tanto da superfície da casca como do conteúdo dos ovos (Tabela 1).

Não houve interação para a variável contagem de enterobactérias do conteúdo cecal de pintos neonatos em $\log_{10}$ em UFC/mL ($p>0,05$). Para as demais variáveis analisadas como contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais, contagem de enterobactérias do saco vitelínico e bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal houve interação entre o tipo de ovo e o momento da sanitização (Tabela 2).

Tabela 2. Contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais (BMT) do saco vitelínico, contagem de enterobactérias (ENTER) do saco vitelínico e conteúdo cecal e bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal (BAL) de pintos neonatos em log₁₀ UFC/mL log₁₀ de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	BMT (UFC/ml) *	ENTER (UFC/ml) *	ENTERC (UFC/ml) *	BAL (UFC/ml) *
Ninho	4,54	3,90	5,99	9,72
Cama	5,36	5,01	6,18	9,84
Momento da sanitização				
30 minutos	4,64	4,08	6,18	9,73
2 horas	5,20	4,72	5,98	9,83
Valor de P				
Tipo de ovo	0,0044	0,0007	0,33274	0,5321
Sanitização	0,0366	0,0046	0,2789	0,4642
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,0335	0,0030	0,2885	0,0166
Erro padrão da média	0,3117	0,3644	0,1840	0,2065
CV (%)	18,77	21,73	10,44	7,01

BMT = contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais do saco vitelínico; ENTER = contagem de enterobactérias do saco vitelínico; ENTERC = contagem de enterobactérias do conteúdo cecal BAL = contagem de bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal.
CV = coeficiente de variação.

Tabela 3. Contagem de BMT do saco vitelínico em log₁₀ UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos

Sanitização		
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	3,93bB	5,11aA
Cama	5,40aA	5,30aA

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

Tabela 4. Contagem de ENTER do saco vitelínico em log₁₀ UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos

Sanitização		
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	3,07bB	4,73aA
Cama	5,18aA	4,69aA

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

Tabela 5. Contagem de BAL do conteúdo cecal em log₁₀ UFC/mL de pintos de um dia de acordo com os tratamentos

Sanitização		
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	9,39bB	10,06aA
Cama	10,01aA	9,68aA

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

Pintos provenientes de ovos de ninho sanitizados aos 30 minutos apresentaram menor contagem de BMT e ENTER do saco vitelínico em relação a sanitização após 120 minutos da coleta. Já nos pintos provenientes de ovos de cama a contagem de BMT e ENTER no saco vitelínico não diferiu entre os dois momentos de sanitização. Na sanitização após 30 minutos da coleta, pintos provenientes de ovos de cama apresentaram maior contagem de BMT e ENTER do saco vitelínico comparado aos pintos provenientes de ovos de ninho. Por fim, a sanitização após 120 minutos não houve diferença na contagem de BMT e ENTER do saco vitelínico provenientes dos dois tipos de ovos coletados.

Pintos provenientes de ovos de ninho sanitizados com 30 minutos apresentaram menor contagem de BAL no conteúdo cecal em relação à sanitização após 120 minutos da coleta. Já nos pintos provenientes de ovos de cama a contagem de BAL do conteúdo cecal não diferiu entre os dois momentos de sanitização. Na sanitização após 30 minutos da coleta, pintos provenientes de ovos de ninho apresentaram menor contagem de BAL do conteúdo cecal comparado aos pintos provenientes de ovos de cama. Na sanitização após 120 minutos não houve diferença na contagem de BAL do conteúdo cecal provenientes dos dois tipos de ovos coletados.

As amostras identificadas no método MALDI-TOF das principais superfícies do aviário apresentaram os filos Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria.

A metodologia MALDI-TOF foi capaz de identificar 41,94% (13/31) das colônias selecionados das placas dos suabes realizados das superfícies ao nível de gênero e 6,45% (2/31) ao nível de espécie. O método não identificou 51,61% (16/31) das colônias selecionadas das placas, sendo a cama do aviário o local que teve o maior número de colônias não identificadas (61,54% - 8/13).

O filo Firmicutes foi o mais prevalente das amostras nessas superfícies, acompanhado, em segundo lugar, pelo Actinobacteria e, em menor proporção, o filo Proteobacteria. Os isolados foram representados com os percentuais de 46,66% (7/15), 33,34% (5/15) e 20% (3/15), respectivamente.

O gráfico 1 apresenta a composição da microbiota identificada pelos filos no método de MALDI-TOF das superfícies, divididos por boca de ninhos, esteiras de ovos e a cama, calculados a partir do total de colônias identificadas. Para os suabes realizados nas bocas de ninhos foi detectada apenas a presença do filo Firmicutes (100% - 1/1), enquanto suabes de esteiras foram identificados os três filos, sendo 44,44% (4/9) Firmicutes, 44,44% (4/9) Actinobacteria e 11,12% (1/9) filo Proteobacteria. Por fim, para os suabes de cama, a

distribuição sobre a colônias sobre o total de identificadas foi de 40% (2/5) Firmicutes, 40% (2/5) Proteobacteria e 20% (1/5) Actinobacteria.

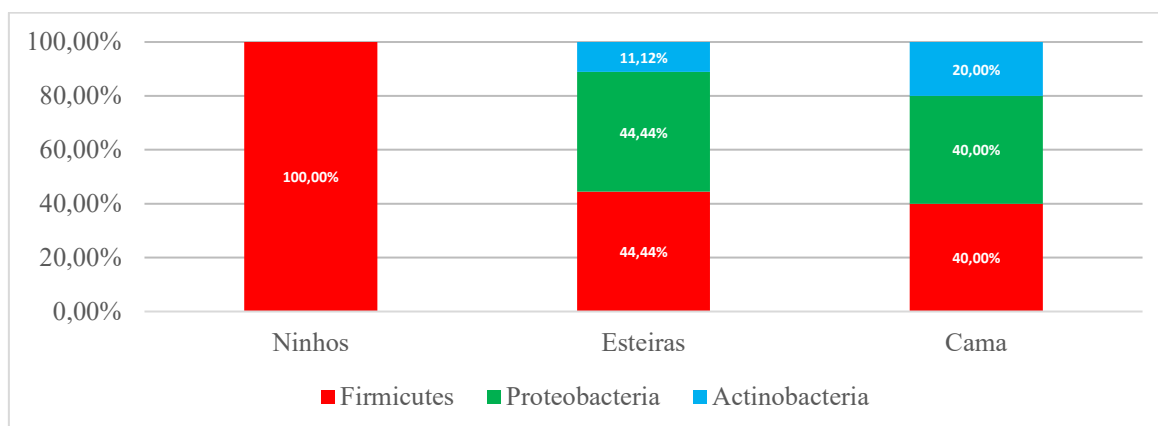


Gráfico 1. Composição da microbiota identificada pelo MALDI-TOF no aviário, divididos por boca de ninhos, esteiras de ovos e a cama, calculados a partir do total de colônias identificadas.

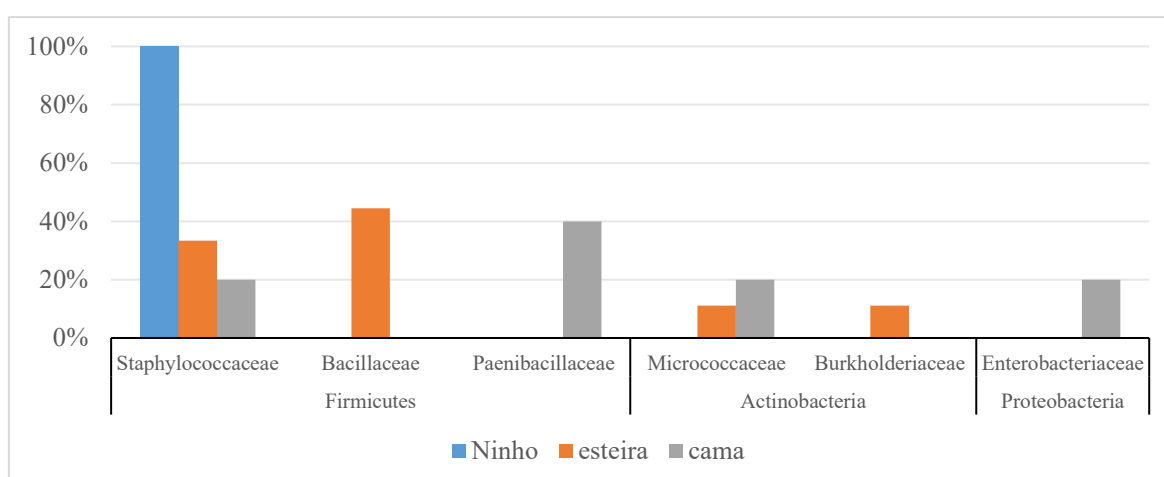


Gráfico 2. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF nas principais superfícies do aviário (ninho, esteiras de ovos e cama). Na sequência, identificações de filo e famílias, organizados por filos e famílias.

O Gráfico 2 apresenta a distribuição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF e organizada por filo e família sobre as principais superfícies dos aviários. Identificou-se ao nível de gênero e espécie em duas amostras, de acordo com as descrições: filo Firmicutes: família Staphylococcaceae (uma identificação de gênero para bocas de ninhos, esteiras de ovos e cama do aviário – *Staphylococcus*); família Bacillaceae (uma identificação de gênero para esteiras de ovos – *Bacillus*); família Paenibacillaceae (identificado como gênero para cama do aviário – *Paenibacillus*). Logo em seguida, representado pelo filo

Actinobacteria: família Micrococcaceae (um gênero para esteiras de ovos e cama do aviário—*Micrococcus*); família Burkholderiaceae (identificado um gênero para esteiras de ovos –*Massilia*). Por fim, filo Proteobacteria: família Enterobacteriaceae (identificado uma espécie para cama do aviário - *Escherichia coli*).

Os filos identificados nas placas da superfície da casca foram os mesmos encontrados para os suabes das superfícies dos aviários, ou seja, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria, distribuídos da seguinte forma: 76,92% (10/13), 15,38% (2/13) e 15,38% (2/13), respectivamente. Os percentuais dos filos isolados da superfície da casca de ovos não sanitizados por tipo de ovo e o momento da refrigeração após a coleta foram: ovos limpos de ninho refrigerados 120 minutos após a coleta (ONR2Hs), Firmicutes de 66,67% (4/7), Actinobacteria 16,67% (1/7) Proteobacteria 16,67 % (1/7). Colônias classificadas da superfície da casca de ovos de cama refrigerados 30 minutos após a coleta (OCR30Min) apresentaram 60% filo Firmicutes (3/5), Proteobacteria 20% (1/5) e Actinobacteria 20% (1/5). Por fim, o percentual do filo identificado da superfície da casca de ovos de cama refrigerados 120 minutos após a coleta (OCR2Hs), foi em 100% Firmicutes.

O gráfico 3 apresenta a distribuição da microbiota identificada na superfície da casca pela metodologia MALDI-TOF, organizada por filo e família de acordo com o tipo de ovo coletado e o momento em que os ovos foram resfriados após a coleta (antes da sanitização), além disso, o método foi capaz de identificar ao nível de gênero e uma identificação ao nível de espécie.

Para as contagens de microrganismos na casca e conteúdo do ovo antes da sanitização, o método MALDI-TOF identificou 50% (14/28) das colônias selecionadas de placas produzidas da superfície da casca do ovo a partir do pool de 4 ovos, dentre as quais foram identificadas 92,85% (13/14) ao nível de gênero e 7,15% (1/14) ao nível de espécie sobre o total de microrganismos identificados. As colônias não identificadas foram de 50% (14/28) do total de colônias enviadas para a análise. Não houve crescimento em placas utilizadas para isolar enterobactérias em nenhum conteúdo do ovo.

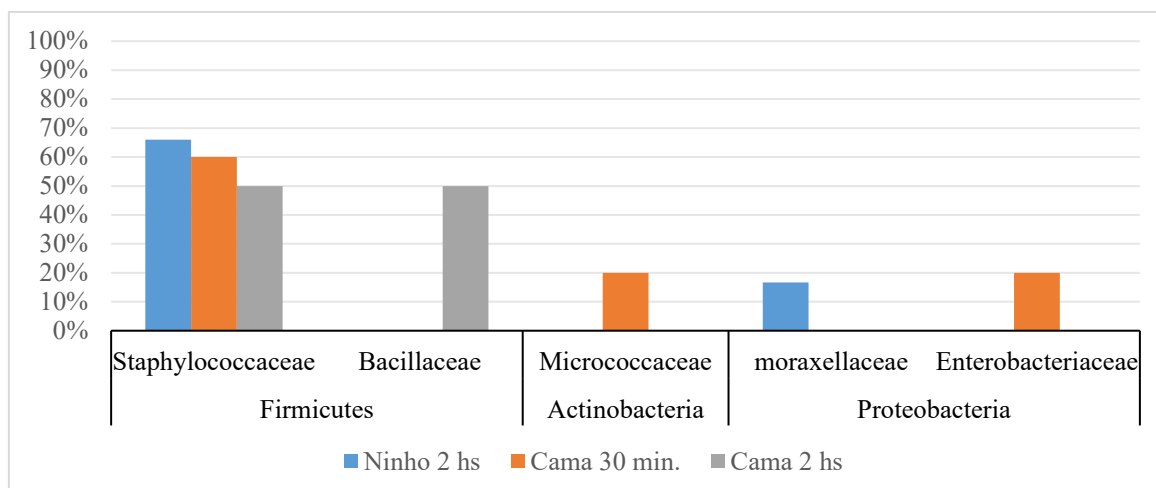


Gráfico 3. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF da casca do ovo de ovos coletados e refrigerados em tempos predeterminados (ovos limpos de ninho refrigerador 2 horas após a coleta – ONR2Hs); ovos de cama refrigerados 30 minutos – OCR30Min e 120 minutos após a coleta – OCR2Hs), organizados por filos e famílias.

A distribuição para colônias da superfície da casca, apresenta filo Firmicutes: família Staphylococcaceae (uma identificação de gênero para ONRHs, OCR30Min e OCR2Hs – *Staphylococcus*), família Bacillaceae (uma identificação de gênero para ONR2Hs e OCR2Hs – *Bacillus*). Em sequência, é apresentado o filo Actinobacteria: família Micrococcaceae (uma identificação de espécie para ONR2Hs – *Micrococcus luteus* e uma identificação de gênero para OCR30Min – *Micrococcus*). Finalmente, o filo Proteobacteria, representado por duas famílias: Moraxellaceaea (uma identificação de gênero para ONR2Hs – *Moraxella*) e família Enterobacteriaceae (uma identificação de gênero para OCR30Min – *Pantoea*).

Para ovos analisados após a sanitização, de acordo com os tratamentos preconizados, MALDI-TOF identificou 69,23% (9/13) das colônias selecionadas de placas da superfície da casca do ovo. Foi possível identificar 100% (9/9) ao nível de gênero sobre o total de microrganismos identificados. Para o conteúdo do ovo, foi possível identificar 40% das colônias enviadas para o MADI-TOF. A metodologia foi capaz de classificar ao nível de gênero 100% do total de colônias identificadas. Não foi possível identificar nenhuma amostra ao nível de espécie para casca e conteúdo do ovo. As porcentagens das colônias não identificadas na superfície da casca e conteúdo do ovo foram de 30,23% (4/13) e 60% (3/5), respectivamente.

Os filos identificados a partir das colônias enviadas da superfície da casca de ovos nos tratamentos preconizados apresentaram as proporções de 37,5% (3/8) Firmicutes, 50% (4/8) Actinobacteria e 12,5% (1/8) filo Proteobacteria.

Os percentuais dos filos identificados na superfície da casca por tipo de ovo e momento da sanitização foram distribuídos da seguinte forma: ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta (ONS30Min), filos Firmicutes e Actinobacteria 20% (1/5) e 80% (3/5), respectivamente. Para ovos limpos de ninho sanitizados 120 minutos após a coleta (ONS2Hs) foi identificado 100% (1/1) filo Firmicutes. Por fim, ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta (OCS30Min) apresentaram distribuições de 50% (1/2) para filo Firmicutes e 50% (1/1) para o filo Proteobacteria. O método MALDI-TOF não foi capaz de identificar colônias referentes aos ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta (OCS2Hs).

As proporções dos filos identificados para colônias do conteúdo do ovo em ONS30Min foi de 100% (2/2) para o filo Proteobacteria. O método não foi capaz de identificar colônias dos demais conteúdos dos ovos, na proporção de 60% (3/5) de não identificadas do total enviado para análise.

O gráfico 4 mostra a distribuição da microbiota identificada na superfície da casca pela metodologia MALDI-TOF, organizada por filo e família, de acordo com os tratamentos. Além disso, o método foi capaz de identificar colônias ao nível de gênero, entretanto, nenhuma identificação ao nível de espécie.

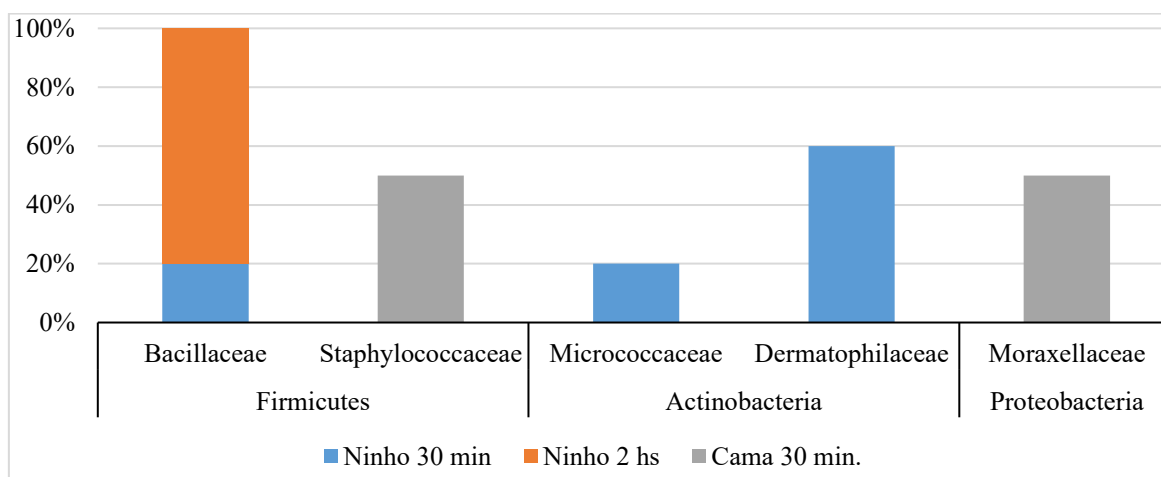


Gráfico 4. Composição da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF da casca do ovo de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados para os tratamentos (ovos limpos de ninho sanitizado 30 Min após a coleta – ONS30Min, ovos limpos de ninho sanitizados 120 minutos após a coleta – ONS2Hs e ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta – OCS30Min), organizados por filos e famílias.

As distribuições estão representadas pelos filos Firmicutes: família Bacillaceae (uma identificação de gênero para ONS30Min e ONS2Hs – *Bacillus*), família Staphylococcaceae (uma identificação de gênero para OCS30Min – *Staphylococcus*). Logo após, seguem as

identificações do filo Actinobacteria: família Micrococcaceae (uma identificação de gênero para ONS30Min - Micrococcus) e família Dermatophilaceae (uma identificação de gênero para três colônias enviadas de ONS30Min – Dermacoccus). Por fim, representado pelo filo Proteobacteria: família Moraxellaceae (uma identificação de gênero para OCS30Min – Moraxella).

Nas identificações das colônias do conteúdo do ovo, foi identificado o filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, gênero Pantoea. As amostras foram provenientes de ONS30Min.

Foram enviados para identificação no método MALDI-TOF colônias de placas com meios específicos para isolamento de *Salmonella* spp. As colônias foram identificadas como suspeitas ou não de acordo com as colorações e características morfológicas apresentadas. Não foi possível identificar por coloração ou morfologia nenhuma colônia com as características do gênero *Salmonella*, bem como nas análises de MALDI-TOF. Contudo, o método foi capaz de identificar 100% ao nível de gênero *Pseudomonas* (12/12), sobre o total de colônias identificadas.

Sobre as colônias identificadas, foram caracterizadas em filo Proteobacteria, família Pseudomonadaceae, gênero *Pseudomonas* spp.

Todas as colônias que cresceram nos meios específicos para isolamento de *Salmonella* foram enviadas para análises. A tabela 6 apresenta o número e frequência dos isolados do gênero *Pseudomonas* e ausência de colônias de *Salmonella* spp no conteúdo de ovos férteis para todas as amostras pesquisadas (resfriadas e sanitizadas após a coleta). Para os ovos resfriados trinta minutos e 120 minutos após a coleta sem sanitização, o crescimento de colônias só foi possível no conteúdo de ovos limpos de ninho e na mesma frequência, independentemente do momento que foram resfriados. Para ovos dos tratamentos, o crescimento das colônias só foi observado em ovos de cama, na mesma frequência, nos dois momentos de sanitização após a coleta. O número de colônias em ovos limpos de ninho foi reduzido em 100% após a sanitização, com indicação da redução da carga microbiana pelo provável efeito da sanitização.

Tabela 6. Número e frequência de *Salmonella spp.* e *Pseudomonas spp.* identificadas no método de MALDI-TOF das colônias selecionadas do conteúdo do ovo antes da sanitização e para cada tratamento preconizado

Microrganismos	Antes da sanitização (resfriados)		Total	Após a sanitização (tratamentos)		Total
	ONR30Min	ONR2Hs		OCS30Min	OCS2Hs	
<i>Pseudomonas putida</i>	4 (50)	4 (50)	8 (100)	2 (50)	2 (50)	4 (100)
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	0	0	0	0

ONR30 = ovos limpos de ninho 30 minutos após a coleta; ONR2Hs = ovos de ninho sanitizados 120 minutos após a coleta; OCS30Min = ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta; OCS2Hs = ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta.

Para as análises do conteúdo do saco vitelínico, as aves selecionadas foram provenientes de ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta (SVN30Min e SVN2Hs) e ovos de cama sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta (SVC30Min e SVC2Hs).

O método MALDI-TOF foi capaz de identificar 92,11% (70/76) do total de colônias enviadas, dentre as quais foram identificadas 59,29% (38/70) ao nível de gênero e 45,71% (32/70) ao nível de espécie sobre o total de microrganismos identificados. As colônias não identificadas representaram 7,89% (6/76) do total de enviadas para a metodologia.

As classificações dos filos ficaram restritas em Firmicutes e Proteobacteria, representados por 12,86% (9/70) e 87,14% (61/70) do total de colônias identificadas, respectivamente. O filo Actinobacteria não foi identificado nas amostras. Para SVN30Min filo Firmicutes representou 6,67% (1/15) e Proteobacteria 93,33% (14/15). Em SVN2Hs e SVC30Min foi identificado apenas o filo Proteobacteria, com 100% (17/17) e (15/15), respectivamente. Por fim, a frequência em SVC2Hs foi de 13% (3/23) para Firmicutes e 86,96% (20/23) Proteobacteria.

No gráfico 5 são apresentadas as distribuições da microbiota identificada pelo método MALDI-TOF das colônias enviadas. A apresentação está por filo e família, sendo filo Firmicutes: família Staphylococcaceae, representado por 6,67% (1/15), família Enterococcaceae em 33,33% (5/15) em SVN30Min e família Enterococcaceae, representado por 13,04% (3/23) em SVC2Hs. Para o filo Proteobacteria as proporções são: família Enterobacteriaceae identificadas em 60% (9/15) em SVN30Min, 100% (17/17) em SVN2Hs e 100% (15/15) SVC30Min, por fim, 86,96% (20/23) em SVC2Hs. A família

Enterobacteriaceae apresentou predominante nas amostras, o que correspondeu a 87,14% sobre o total de famílias identificadas, enquanto as famílias Staphylococcaceae e Enterococcaceae foram representadas por 1,43% e 11,43%, respectivamente.

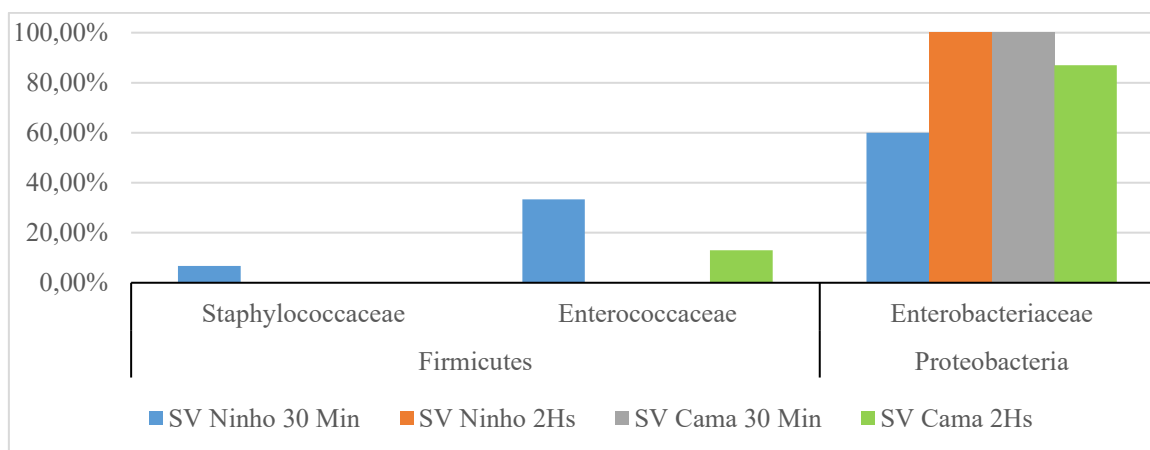


Gráfico 5. Identificação pelo método MADI-TOF da composição da microbiota de sacos vitelínicos de pintos de um dia provenientes de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados, de acordo com os tratamentos (ovos limpos de ninho sanitizados 30 Min após a coleta -SVN30Min e 120 minutos após a coleta – SVN2Hs; ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta – SVC30Min e 120 minutos após a coleta – SVC2Hs), organizados por filos e famílias.

Tabela 7. Número e frequência de bactérias identificadas no método de MALDI-TOF por gênero e espécie de colônias selecionadas de sacos vitelínicos de 12 pintos de um dia para cada tratamento: ovos limpos de ninho ou cama sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta

Microrganismos	Ninho 30 minutos (SVN30Min)			Ninho 120 minutos (SVN2Hs)			Cama 30 minutos (SVC30Min)			Cama 120 minutos (SVC2Hs)		
	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total
<i>Escherichia coli</i>	5 (33,33)	3 (20,00)	8 (53,33)	7 (41,17)	8 (47,06)	15 (88,23)	8 (53,00)	6 (40,00)	15 (100)	8 (34,78)	11 (47,83)	19(82,60)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (33,33)		5 (33,33)	1 (5,88)		1 (5,88)					3 (13,04)	3 (13,04)
<i>Staphylococcus epidermis</i>	1 (6,67)	1 (6,67)	2 (13,34)									
<i>Klebsiela pneumoniae</i>				1 (5,88)		1 (5,88)						
<i>Proteus mirabilis</i>										1 (4,35)		1 (4,35)
Total			15 (100)			17 (100)			15 (100)			23 (100)

A tabela 7 apresenta a distribuição de bactérias classificadas pelo método MALDI-TOF de sacos vitelínicos de pintos de um dia. Para SVN30Min, foram três gêneros (*Escherichia*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*) e duas espécies (*Escherichia coli* e *Staphylococcus epidermis*). Para SVN2Hs a identificação foi de três gêneros (*Escherichia*, *Enterococcus* e *Klebsiella*) e uma espécie (*Escherichia coli*). SVC30Min apresentou a identificação de um gênero (*Escherichia*) e uma espécie (*Escherichia Coli*). Por fim, SVC2Hs com um gênero (*Escherichia*) e duas espécies identificadas (*Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*).

A Microbiota de sacos vitelínicos de SVN30Min apresentou menor frequência (53,33%) para *Escherichia* em comparação às demais amostras, com SVC30Min sendo em maior frequência (100%), seguidos de SVN2Hs (88,23%) e SVC2Hs. (82,60%). O gênero *Staphylococcus* foi identificado apenas em SVN30Min, o que corresponde a 6,67%, enquanto os gêneros *Klebsiella* e *Proteus* foram identificados uma única vez em SVN2HS (5,88%) e SVC2Hs (4,35%), respectivamente.

Para a microbiota total identificada entre os tratamentos, houve maior número de microrganismos classificados para o SVC2Hs (23) em comparação às demais amostras enviadas para o MALDI-TOF (15 – SVN30Min, 17 – SVN2Hs e 15 – SVC30Min), o que corresponde aos pintos de um dia provenientes do tipo de ovo e momento de sanitização com maior possibilidade de desafio microbiológico. Somado a isso, *Escherichia coli* foi a espécie mais frequente em comparação a *Enterococcus faecalis* em todos os ovos, independentemente do momento da sanitização.

Para as análises do conteúdo cecal, as aves selecionadas foram provenientes de ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta (CN30Min e CN2Hs) e ovos de cama sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta (CC30Min e CC2Hs).

O método foi capaz de identificar 97,73% (86/88) das colônias enviadas, a partir do conteúdo cecal de cada pinto dos tratamentos. Não foi possível identificar duas colônias (2,27% - 2/88). A partir das colônias identificadas foi possível caracterizar 79,07% (68/86) ao nível de gênero e 20, 93% (18/85) ao nível de espécie.

As identificações dos filos, foram restritas para Firmicutes e Proteobacteria, sendo representados nas frequências de 72,10% (62/86) e 27,90% (24/86), respectivamente. A distribuição dos isolados para cada tratamento seguiram os percentuais: CN30Min, Firmicutes, com 52,38% (11/21) e Proteobacteria em 47,62%, CN2Hs, Firmicutes em 76,92% (20/26) e Proteobacteria em 23,08% (6/26); CC30Min, 80% Firmicutes e 20% Proteobacteria, por fim, em CC2Hs 78,95% (15/19) filo Firmicutes e 21,05% (4/19).

No gráfico 6 estão apresentado os filos, frequência das famílias e as suas distribuições dentro dos tratamentos: Para CN30Min, filo Firmicutes, famílias Enterococcaceae com 47,62% (10/21), Bacillaceae com 4,76% (1/21) e filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, frequência de 47,62% (10/21); Para CN2Hs, filo Firmicutes, famílias Enterococcaceae 73,08% (19/26), Bacillaceae com 3,85% (1/26) e filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae com frequência de 23,08% (6/26); Em CC30Min, família Enterococcaceae com 80% (16/20) e filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae com 20% (4/20). Por fim, em CC2Hs, filo Firmicutes, família Enterococcaceae 78,95% (15/19) e filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae, frequência de 21,05% (4/19).

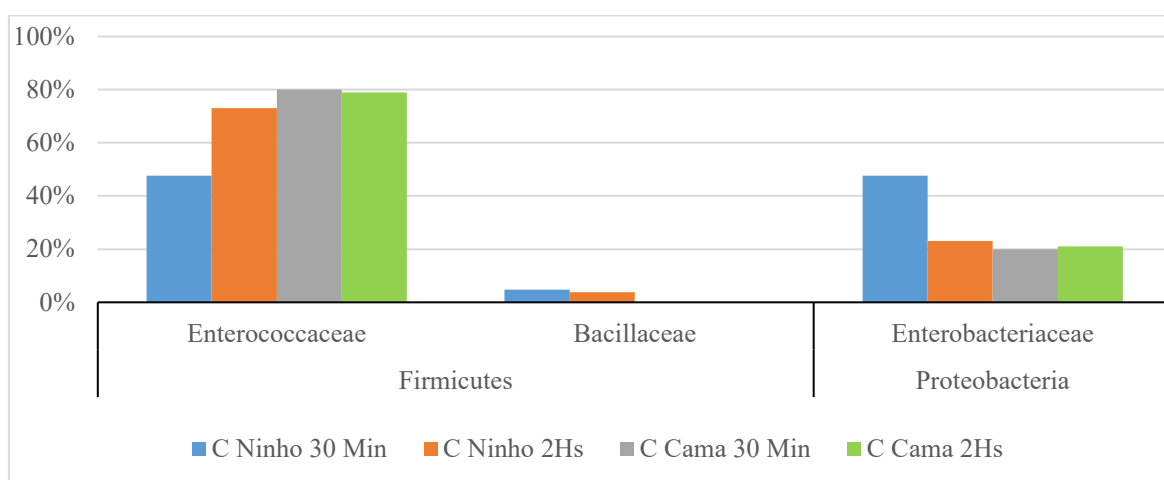


Gráfico 6. Identificação pelo método MADI-TOF da composição da microbiota do conteúdo cecal de pintos de um dia provenientes de ovos coletados e sanitizados em tempos predeterminados, de acordo com os tratamentos (ovos limpos de ninho sanitizados 30 Min após a coleta – CN30Min e 120 minutos após a coleta – CN2Hs; ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta – CC30Min e 120 minutos após a coleta – CC2Hs), organizados por filos e famílias.

A tabela 8 representa a distribuição da classificação da microbiota do conteúdo cecal por gênero e família.

Tabela 8. Número e frequência de bactérias identificadas pelo método de MALDI-TOF por gênero e espécie de colônias selecionadas de conteúdo cecais de 12 pintos de um dia para cada tratamento: ovos limpos de ninho ou cama sanitizados 30 minutos e 120 minutos após a coleta

Microrganismos	Ninho 30 minutos (CN30Min)			Ninho 120 minutos (CN2Hs)			Cama 30 minutos (CC30Min)			Cama 120 minutos (CC2Hs)		
	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total	Gênero	Espécie	Total
Escherichia coli	8 (31,10)		8 (31,10)	6 (23,08)		6 (23,08)	4 (20,00)		4 (20,00)	4 (21,05)		4 (21,05)
				13	6		13	3		12	3	
Enterococcus faecalis	5 (23,81)	5 (23,81)	10 (47,62)	(50,00)	(23,08)	19 (73,08)	(65,00)	(15,00)	16 (80,00)	(63,16)	(15,79)	15 (78,95)
Klebsiela pneumoniae	1 (4,76)	1 (4,76)	2 (9,52)									
Bacillus licheniformis	1 (4,76)		1 (4,76)									
Bacillus megaterium				1 (3,85)		1 (3,85)						
Total			21 (100,00)			26 (100,00)			20 (100,00)			19 (100,00)

Tabela 9. Percentual médio da fertilidade (Fert.), eclodibilidade do número total de ovos incubados (Eclod), eclodibilidade do número total de ovos férteis incubados (Eclod fert.) de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	¹ Fert. (%)	² Eclod (%)	³ Eclod fert (%)
Ninho	86,79	75,66	87,12
Cama	86,90	74,62	85,78
Momento da sanitização			
30 minutos	86,50	74,96	86,61
2 horas	87,18	75,32	86,28
Valor de P			
Tipo de ovo	0,9309	0,5379	0,2723
Sanitização	0,5943	0,8296	0,7829
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,1007	0,1003	0,3308
Erro padrão da média	1,2675	1,6738	1,1897
CV (%)	4,83	7,37	4,60

Fert. = Fertilidade; Eclod = percentual médio da eclodibilidade do número total de ovos incubados; Eclod fert = eclodibilidade do número de ovos férteis incubados

¹Fertilidade (%) = (número de ovos férteis/número de ovos incubados) x 100

²Ecloração (%) = (número de ovos eclodidos/número de ovos incubados) x 100

³Eclodibilidade de ovos férteis (%) = (número de ovos eclodidos/número de ovos férteis incubados) x 100

A Tabela 9 apresenta os percentuais de fertilidade, eclodibilidade tanto do número total de ovos quanto do número de ovos férteis incubados de ovos limpos de ninho e ovos de cama de acordo com o momento da sanitização.

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis fertilidade, eclosão sobre o total de ovos incubáveis e eclosão sobre o total de ovos férteis ($P>0,05$) (Tabela 9).

Houve interação entre o tipo de ovo e o momento da sanitização para a mortalidade inicial (0 a 7 dias) ($P<0,05$). O número de ovos bicados vivos e o número de ovos contaminados foram maiores para ovos de ninho ($P<0,05$). As outras variáveis de incubação não foram afetadas ($P>0,05$) (Tabela 10).

Tabela 10. Embriodiagnóstico de ovos limpos de ninho e cama sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta

Tipo de ovo	¹ Mort. 0 a 7 (%)	² Mort. 8 a 14 (%) *	³ Mort. 15 a 21 (%)	⁴ Bicados vivos (%) *	⁵ Bicados Mortos (%) *	⁶ Contam. (%) *
Ninho	6,96	0,57	3,32	0,98a	0,62	0,43b
Cama	8,02	0,72	3,44	0,28b	0,37	1,41a
Momento da sanitização						
30 minutos	8,13	0,71	3,01	0,57	0,38	0,63
2 horas	6,85	0,58	3,75	0,70	0,62	1,21
Valor de P						
Tipo de ovo	0,3192	0,6407	0,8627	0,0388	0,2862	0,0252
Sanitização	0,2298	0,7094	0,2950	0,6903	0,2952	0,1845
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,0035	0,7135	0,3038	0,2465	0,0564	0,4766
Erro padrão da media	0,9510	0,2360	0,6988	0,3354	0,2344	0,4473
CV (%)	38,25	167,33	69,12	170,41	150,10	152,85

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey (5%)

*Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

Mort.0 a 7 = mortalidade inicial embrionária de 0 a 7 dias; Mort. 8 a 14 = mortalidade intermediária embrionária de 8 a 14 dias; 3Mort. 15 a 21 = mortalidade final embrionária de 15 a 21 dias.

¹Mortalidade inicial (%) = (números de embriões mortos de 0 a 7 dias de incubação/número total de ovos férteis incubados) x 100.

²Mortalidade intermediária (%) = (números de embriões mortos de 8 a 14 dias de incubação/número total de ovos férteis incubados) x 100.

³Mortalidade final (%) = (números de embriões mortos de 15 a 21 dias de incubação/número total de ovos férteis incubados) x 100.

⁴Bicados vivos (%) = (número de ovos bicados vivos/número total de ovos férteis incubados) x 100

⁵Bicados mortos (%) = (número de ovos bicados mortos/número total de ovos férteis incubados) x 100.

⁶Contam. (%) = (número de ovos contaminados/número total de ovos férteis incubados) x 100

Tabela 11. Mortalidade embrionária inicial (0 a 7 dias de incubação) de ovos de cama ou de ninho sanitizados 30 minutos ou 120 minutos após a coleta

	Sanitização	
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	8,85Aa	5,06Bb
Cama	7,39Aa	8,63Aa

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Tukey (5%)

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis mortalidade intermediária (8 a 14 dias), mortalidade final (15 a 21 dias), bicados vivos, bicados mortos ($p > 0,05$).

Houve efeito do tipo de ovo sobre o índice de ovos contaminados. Ovos coletados na cama apresentaram maior contaminação em comparação com ovos coletados no ninho ($p < 0,05$).

Para a variável mortalidade inicial (0 a 7 dias), houve interação entre os fatores ($p < 0,05$). Ovos de ninhos sanitizados 30 minutos após a coleta apresentaram mortalidade inicial superior aos ovos de ninho sanitizados 120 minutos após a coleta. Além disso, ovos

de cama sanitizados 120 minutos após a coleta apresentaram maior mortalidade inicial que ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta.

Independente do tipo de ovo, a mortalidade inicial não foi afetada pela sanitização após 30 minutos da coleta. Entretanto a sanitização dos ovos após 120 minutos da coleta afetou a mortalidade inicial, onde ovos provenientes de ninho tiveram menor mortalidade em comparação aos ovos coletados na cama.

Tabela 12. Percentual médio de pintos de segunda, qualidade do umbigo (tipo 1, tipo 2, tipo

Tipo de ovo	Qualidade do umbigo (%)					
	¹ Pintos Segunda (%)	² Tipo 1 (%)	³ Tipo 2 (%)	⁴ Tipo 3 (%)	⁵ Abdômen volumoso (%) *	⁶ Elimin (%)
Ninho	52,99	41,55	31,37	4,99	13,18	9,61
Cama	43,11	42,67	33,05	6,68	8,87	8,08
Momento da sanitização						
30 minutos	48,27	42,01	32,54	6,25	12,69	7,21
2 horas	47,82	42,21	31,89	5,61	9,37	10,48
Valor de P						
Tipo de ovo	0,5380	0,7884	0,6187	0,2640	0,1011	0,4835
Sanitização	0,9292	0,9615	0,8471	0,6986	0,2010	0,1380
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,2468	0,4249	0,7895	0,2515	0,7013	0,7352
Erro padrão da média	5,1066	4,0248	3,2564	1,6436	2,6146	2,1553
CV (%)	34,33	32,57	34,61	92,19	77,18	80,89

3), percentual de pintinhos com abdômen volumoso e eliminados de acordo com os tratamentos

¹Pinto de segunda = (número de pintos considerados de segunda/número total de pintos nascidos) x100.

²Qualidade do umbigo Tipo 1 = (número de pintos com umbigo com discretas lesões/número total de pintos de segunda) x 100.

³Qualidade do umbigo Tipo 2 = (número de pintos com umbigo com moderadas lesões/número total de pintos de segunda) x 100.

⁴Qualidade do umbigo Tipo 3 = (número de pintos com umbigo com intensas lesões/número total de pintos de segunda) x 100.

⁵Abdômen volumoso = (número de pintos considerados com aumento exacerbado do abdômen/número total de pintos nascidos) x 100

⁶Elimin = (número de pintos eliminados durante a seleção/número total de pintos nascidos) x 100.

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis da qualidade dos pintos avaliadas ao final da incubação ($p>0,05$).

Tabela 13. Peso dos pintos (g), em gramas, peso relativo médio do saco vitelínico (%), peso dos pintos sem o saco vitelínico (%) de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	Peso Relativo Saco Vitelínico (%)	Peso pinto sem o saco Vitelínico (g)
Ninho	7,16	42,87
Cama	8,09	43,97
Momento da sanitização		
30 minutos	7,70	43,29
2 horas	7,55	43,55
Valor de P		
Tipo de ovo	0,2989	0,2178
Sanitização	0,8687	0,7643
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,1912	0,4480
Erro padrão da média	1,1194	1,8433
CV (%)	40,15	7,06

Peso relativo do Saco Vitelínico (%) = (peso do Saco Vitenilo em gramas 24 horas após o nascimento/peso do pinto em gramas 24 horas após o nascimento) x 100.

Peso do pinto sem o Saco Vitenilo (g) = peso do pinto em gramas 24 horas após o nascimento, descontado o peso em gramas do Saco Vitenilo.

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de desempenho do frango de corte avaliadas 24 horas após o nascimento ($p>0,05$).

Tabela 14. Desempenho de frango de corte aos sete dias de idade de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	PI (g)	CR(g)	GP (g)	CA (Kg/Kg)	*VIAB (%)
Ninho	47,39	120,63	158,75	0,763	94,95b
Cama	46,67	120,84	158,21	0,763	99,35a
Momento da sanitização					
30 minutos	46,95	121,22	159,10	0,763	96,23
2 horas	47,10	120,24	157,87	0,763	98,07
Valor de P					
Tipo de ovo	0,4963	0,9146	0,8549	0,9561	0,0202
Sanitização	0,8850	0,6163	0,6784	0,9561	0,3045
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,1968	0,4586	0,9752	0,4768	0,0889
Erro padrão da média	0,4416	1,8264	2,7253	0,0138	2,0154
CV (%)	7,78	3,89	4,49	4,8	4,4

Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

PI (g) = peso inicial; CR (g) = consumo de ração; GP (g) = ganho de peso; CA (kg/kg) = conversão alimentar; VIAB = viabilidade.

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de desempenho avaliadas aos sete dias de idade ($p>0,05$).

Houve efeito do tipo de ovo sobre a viabilidade semanal ($p<0,05$). Aves provenientes de ovos coletados nos ninhos apresentaram menor viabilidade semanal em comparação com ovos coletados na cama ($p<0,05$) aos sete dias de idade

Tabela 15. Desempenho de frango de corte aos 14 dias de idade de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	CR (%)	GP (g)	CA (Kg/Kg)	*VIAB (%)
Ninho	574,91	517,49	1,111	99,35a
Cama	573,88	523,42	1,092	95,59b
Momento da sanitização				
30 minutos	573,88	519,13	1,106	95,51
2 horas	574,91	521,77	1,100	95,51
Valor de P				
Tipo de ovo	0,8995	0,2799	0,3107	0,0060
Sanitização	0,8995	0,6264	0,6243	0,3184
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,4340	0,6281	0,4510	0,1037
Erro padrão da média	6,4560	5,1868	0,0175	2,0154
CV (%)	3,45	2,51	4,10	4,77

*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

CR (g) = consumo de ração, GP (g) = ganho de peso; CA (kg/kg) = conversão alimentar; VIAB (%)= viabilidade

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar aos 14 dias de idade ($p>0,05$).

Houve efeito do tipo de ovo sobre a viabilidade semanal ($p<0,05$). Aves provenientes de ovos coletados na cama apresentaram menor viabilidade semanal em comparação com ovos coletados no ninho ($p<0,05$) aos 14 dias de idade.

Tabela 16. Desempenho de frango de corte aos 21 dias de idade de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	CR (%)	GP (g)*	CA (Kg/Kg)	*VIAB (%)
Ninho	1338,74	1093,11	1,243	98,66
Cama	1342,95	1117,64	1,204	95,83
Momento da sanitização				
30 minutos	1342,11	1100,68	1,221	98,61
2 horas	1339,59	1110,07	1,226	95,88
Valor de P				
Tipo de ovo	0,8102	0,1886	0,0651	0,1412
Sanitização	0,8857	0,6079	0,8017	0,1560
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,5258	0,9690	0,1897	0,9769
Erro padrão da média	13,1744	17,6706	0,0202	2,0154
CV (%)	3,16	3,99	3,93	4,65

*Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

CR (g) = consumo de ração, GP (g) = ganho de peso; CA (kg/kg) = conversão alimentar; VIAB (%)= viabilidade

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar e viabilidade semanal aos 21 dias de idade ($p>0,05$).

Não houve interação e nem efeito dos tratamentos para a viabilidade semanal aos 28 dias de idade ($p>0,05$).

Tabela 17. Desempenho de frango de corte aos 28 dias de idade de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	CR (%)	GP (g)	CA (kg/kg)	VIAB (%)
Ninho	2465,67	1791,85	1,342	99,30
Cama	2511,02	1.845,04	1,392	98,41
Momento da sanitização				
30 minutos	2465,98	1797,24	1,338	99,30
2 horas	2510,71	1839,65	1,333	98,40
Valor de P				
Tipo de ovo	0,2605	0,1698	0,3717	0,4722
Sanitização	0,2670	0,2696	0,6743	0,4722
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,9552	0,8137	0,6743	0,0766
Erro padrão da média	32,5908	37,6535	0,0129	2,0154
CV (%)	3,86	5,03	2,51	3,03

CR (g) = consumo de ração, GP (g) = ganho de peso; CA (kg/kg) = conversão alimentar; VIAB (%) = viabilidade

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de consumo de ração, ganho de peso, conversão alimentar e viabilidade aos 28 dias de idade ($p>0,05$).

Tabela 18. Desempenho de frango de corte aos 35 dias de acordo com os tratamentos

Tipo de ovo	CR (%) *	GP (g) *	CA (kg/kg)	VIAB (%)	IEP
Ninho	3805,56	2603,97	1,439	90,39	466,49
Cama	3848,22	2657,84	1,426	85,26	448,49
Momento da sanitização					
30 minutos	3806,63	2600,77	1,442	91,03	467,58
2 horas	3847,15	2661,03	1,443	84,62	447,40
Valor de P					
Tipo de ovo	0,5658	0,4545	0,5255	0,1458	0,0853
Sanitização	0,5852	0,4036	0,3849	0,1459	0,0558
Tipo de ovo*Sanitiz.	0,9113	0,6887	0,5255	0,0203	0,0001
Erro padrão da média	37,6127	68,2426	0,0202	4,4225	14,5670
CV (%)	4,68	6,58	3,35	10,68	5,32

CR (g) = consumo de ração, GP (g) = ganho de peso; CA (kg/kg) = conversão alimentar, VIAB = viabilidade; IEP = índice de eficiência produtiva

Não houve interação e efeito dos tratamentos para as variáveis de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar aos 35 dias de idade ($p>0,05$).

Tabela 19. Viabilidade (%) aos 35 dias de acordo com os tratamentos

	Sanitização	
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	88,47Aa	92,31Aa
Cama	92,31Aa	76,92Bb

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Tukey (5%).

Tabela 20. Índice de eficiência produtiva (IEP) aos 35 dias de acordo com os tratamentos

	Sanitização	
	30 minutos	Após 2 horas
Ninho	453,27Aa	479,71Aa
Cama	481,89Aa	415,09Bb

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Tukey (5%).

Para a viabilidade aos 35 dias, houve interação entre os fatores ($p < 0,05$). A viabilidade aos 35 dias não foi afetada, independentemente do tipo de ovo, pela sanitização após 30 minutos da coleta. Já a sanitização dos ovos após 2 horas da coleta afetou a viabilidade final do frango de corte, onde aves provenientes de ovos de cama apresentaram viabilidade final em comparação às aves provenientes de ovos coletados no ninho.

Ovos provenientes de ninho não afetaram a viabilidade final do frango de corte independentemente do momento da sanitização. Já para os ovos de cama, a sanitização após 30 minutos aumentou a viabilidade final do frango de corte aos 35 dias em comparação aos ovos sanitizados após 2 horas da coleta.

Para o índice de eficiência produtiva (IEP) aos 35 dias, houve interação entre os fatores ($p < 0,05$). O índice de eficiência produtiva não foi afetado, independentemente do tipo de ovo, pela sanitização após 30 minutos da coleta. Já a sanitização dos ovos após 2 horas da coleta afetou o índice de eficiência produtiva, onde aves provenientes de ovos de cama apresentaram menor IEP em comparação às aves provenientes de ovos coletados no ninho.

Não houve diferença do Índice de Eficiência Produtiva para os ovos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta em relação aos ovos de ninho sanitizados após 2 horas. Já para o frango de corte proveniente dos ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta melhorou o IEP em relação ao frango de corte proveniente dos ovos sanitizados após 120 minutos.

DISCUSSÃO

O tipo de ovo e o momento da sanitização não afetaram os principais parâmetros de rendimento de incubação avaliados. Entretanto, ovos coletados da cama apresentaram maior contaminação em relação aos ovos coletados no ninho, resultado este esperado em função da maior contaminação da cama dos aviários. Esta maior contaminação dos ovos de cama e o momento da sanitização foram determinantes no desempenho das aves. Aves provenientes de ovos de cama e sanitizados 120 minutos após a coleta tiveram menor viabilidade o que comprometeu o índice de eficiência produtivo aos 35 dias.

Sobre o quadro sanitário da granja, o uso da contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae para avaliar contaminações dos aviários pode fornecer dados interessantes sobre a implantação de eficientes modelos ou não do ponto de vista de biossegurança, bem como o nível de higienização dos ovos para a incubação (Musgrove et al., 2014). Muitas bactérias patogênicas são pertencentes a esta família, em destaque a *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e *Escherichia coli*. Graves e MacLaury (1962), em estudo com a correlação entre condições climáticas ambientais e a contaminações da superfície da casca de ovos férteis, evidenciaram que ao aumentar a temperatura e umidade relativa do ambiente havia o favorecimento da multiplicação de famílias de bactérias, entre elas a Enterobacteriaceae.

Em relação às contagens dos microrganismos sobre a superfície da casca dos ovos, os efeitos dos tratamentos não afetaram BMT e demais variáveis, ENTER, F/LEV da superfície da casca e ENTERC e F/LEVC do conteúdo do ovo após a sanitização, sendo que todos os valores ficaram abaixo de 5,0 UFC/mL. A ausência de diferença significativa observada entre os tratamentos para estas variáveis indica que o tipo de ovo, com qualquer um dos procedimentos de sanitização testados, não foi suficiente para afetar esses parâmetros. De Reu et al. (2005) sugerem que em boas condições de higiene do ambiente de produção os valores da contagem de bactérias mesófilas aeróbica totais se encontram abaixo de 5,0 UFC/mL log¹⁰.

Os baixos valores encontrados na contagem microbiológica da casca se dão ao fato dos ovos do experimento terem sido expostos a reduzido desafio microbiológico após a postura e isto se dá, principalmente, ao período do ano de realização da experimentação, com possível redução da pressão microbiológica no ambiente da granja, principalmente na cama do aviário. A possível qualidade da cama e do ambiente de produção podem interferir positivamente sobre o grau de contaminação ambiental. Board e Trander (1995) concluíram

que logo após a postura, a superfície da casca pode ser contaminada em contato com qualquer superfície do aviário e a gravidade desta contaminação se deve às condições e manutenção da higiene e limpeza destas instalações (Board e Trander, 1995).

Conteúdo do saco vitelínico de pintos oriundos de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta apresentou resultado de contagem de microorganismo superior ao conteúdo aos demais tratamentos

O binômio tempo e sanitização foi a possível causa da maior contagem de microrganismos no conteúdo do saco vitelínico de pintos provenientes de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta.

A metodologia experimental utilizada para a seleção e limpeza de sujidades na superfície da casca desta categoria de ovo também pode ter contribuído para esses valores. A aplicação simulou a rotina de limpeza dos ovos nas unidades produtoras antes da sanitização, quando os intervalos foram próximos de duas horas para dar-se início das retiradas das sujidades, tempo provável para maior penetração de microorganismo para o conteúdo interno do ovo, principalmente pelo resfriamento completo da superfície da casca e, consequentemente, sobre efeito do gradiente de temperatura, pôde carrear microrganismos com real potencial contaminante. Por fim, é aceitável contextualizar uma possível proliferação gradual microbiana no período de incubação dos ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta, visto que o processo é constituído por condições adequadas de crescimento microbiológico, em destaque temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes. Dados obtidos por Magwood (1964) corroboram com este argumento. O autor concluiu que a contagem bacteriana da superfície da casca aumenta durante a incubação e, consequentemente, de acordo com Cortés et al. (2004), esse fator pode se tornar provável causa de contaminação do saco vitelínico.

Pode-se concluir que, pelo potencial de contaminar os ovos e o percentual de colônias não identificadas das amostras de cama (61,54% - 8/13), que a quantidade de dois suabes não tenha sido suficiente para amostragem deste tipo de ambiente. Importante, em estudos futuros em que a cama seja alvo de avaliação, ou seja, elevar o número de amostras coletadas. A intenção é caracterizar de forma mais eficiente a microbiota existente na cama e o potencial de contaminação desta superfície. De Reu, (2006), relatou que os ovos são mais susceptíveis à penetração de microrganismos devido ao gradiente de temperatura e a contaminação pode aumentar quando a oviposição é realizada em ambientes sujos. Neste caso, comparar a cama dos aviários do experimento com esse ambiente é plausível, pois o

grau de contaminação pode ser mais elevado e, somado a isso, a exposição do ovo com esse tipo de material pode resfriá-lo em um menor tempo.

Bruce e Drysdale (1994), descreveram que existem amplas evidências de que ovos postos em um ambiente altamente contaminado são mais deteriorados que aqueles postos em ambientes limpos. Os autores concluíram que apenas o fator umidade pode não ser primordial para a contaminação e que o contato direto com as excretas influencia negativamente, de alguma forma, na proteção natural do ovo, por substâncias que podem reduzir a tensão superficial da umidade na superfície da casca, com elevação da taxa de penetração dos microrganismos e, consequentemente, proporcionando maior contaminação.

Drysdale (1995) desafiou ovos incubáveis de matrizes de corte a três situações e observou que os resultados de isolamento e identificação em ovos não eclodidos de cada tratamento apresentaram isolados de *Proteus* spp. na proporção de 8% (8/100), 2% (2/100) e 1% (1/100), respectivamente, enquanto no grupo controle não houve isolamento da bactéria (0/100). Desta forma, o autor concluiu que ovos são mais propensos a contaminação quando expostos às superfícies muito sujas, como exemplo, o contato direto com as excretas das aves ou a cama do aviário.

Destaque para família Enterobacteriaceae, com presença única no ambiente da cama e representada pela *Escherichia coli*. Essa família tem grande importância para a avicultura. Infecções do umbigo e saco vitelínico ou ambos, caracteriza quadros de onfalite no campo e, em sua maioria, têm diagnósticos laboratoriais com a presença de *Escherichia coli* (Almeida et. al., 2016).

Para as caracterizações microbiológicas da superfície da casca e conteúdo do ovo antes da sanitização, não houve crescimento de colônias em placas em ágar MacConkey (BD Difcotm™, Sparks, Maryland, EUA) para o conteúdo do ovo. O resultado obtido pode ser explicado pelo reduzido tempo para multiplicação bacteriana entre a coleta e refrigeração dos ovos, além disso, a presença dos fatores intrínsecos antimicrobianos do conteúdo do ovo, constituintes naturais do albúmen, podem ter inibido o crescimento microbiano.

A defesa antimicrobiana do albúmen se deve provavelmente pela imobilização das bactérias, o efeito bactericida de proteínas, à indisponibilidade de nutrientes para as bactérias e inibição de enzimas (Brake et al., 1997). Não houve coleta do material para análise do conteúdo do ovo em ágar PCA (Oxoid LTDA, Basindstone, Hampshire, Inglaterra). Para experimentos futuros sugere-se utilizar o meio ágar PCA em análises de conteúdo do ovo, sendo o meio de escolha para bactérias aeróbicas mesófilas totais, visto que não houve crescimento de microrganismo no ágar escolhido para esta análise (MacConkey).

A identificação da família Enterobacteriaceae apenas na superfície da casca de ovos de cama não sanitizados pode indicar o maior grau de contaminação para este tipo de ambiente (sujo), visto que não é comum, pelas condições adversas, isolar microrganismo Gram-negativos sobre a superfície da casca. (Board e Tranter, 1995). De acordo com os autores, o mais comum é o isolamento de bactérias Gram-positivas, as quais têm características de resistência ao ambiente com baixa umidade da superfície da casca.

Para as caracterizações microbiológicas da casca e conteúdo dos ovos após a sanitização do experimento (tratamentos), o filo Actinobacteria foi identificado com maior frequência na superfície da casca de ONS30Min (80%) e 20% em ONS2Hs, enquanto filo Firmicutes foi identificado em 100% em ONS2Hs. OCS30Min apresentaram os filos Firmicutes e Proteobacteria na mesma proporção (50%). Entretanto, para este último filo, diferentemente das amostras de suabes das principais superfícies do aviário e de ovos resfriados, não foi identificada a família Enterobacteriaceae.

A presença do filo Proteobacteria nos suabes coletados da cama dos aviários e na superfície da casca de ovos postos neste ambiente, os quais tiveram contato direto com a umidade e excretas das aves, independente se foram ou não sanitizados, indica a presença desse filo em ambientes sujos do aviário. Desta forma, há indícios que a cama dos aviários pode ser fonte de contaminação pela família Enterobacteriaceae em ovos que tiveram contato com o material logo após a postura. De acordo com Mauldin (1999), no momento da postura o número de bactérias na superfície da casca do ovo pode variar de 300 a 500. Em um ambiente adequado de crescimento este número pode aumentar muito rápido, de modo que uma hora após a postura, pode haver 20.000 a 30.000 bactérias presentes (North e Bell, 1990). Caso a superfície da casca esteja suja, este número pode aumentar para 80.000 (Mauldin, 1999), o que pode explicar o maior índice de ovos provenientes de cama contaminados observados na incubação do experimento.

Para análises no experimento sobre o conteúdo do ovo, destaca-se a identificação do filo Proteobacteria, família Enterobacteriaceae em ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta (ONS30Min). O filo é composto por bactérias Gram-negativas, que apresenta os gêneros de relevância patogênica para a avicultura e saúde humana. Destacam-se na família as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas* (Madigan et al., 2010). A presença da família apenas em conteúdo dos ovos limpos de ninho pode ser explicada. O ovo possui importantes agentes quelantes que se ligam aos nutrientes, o que dificulta a utilização por microrganismos invasores, principalmente os Gram-negativos. Entretanto, o filo Proteobacteria pôde ser encontrado no conteúdo de ovos limpos de ninho pela sua

capacidade de resistir aos mecanismos naturais intrínsecos de defesa do ovo (Board e Trander 1995). Corroborando com os autores, Raspoet et al., (2014) demonstraram que, apesar da função quelante de algumas proteínas do albúmen, por exemplo, ao ferro, *Salmonella* spp. possuem elevada afinidade ao elemento Fe^{3+} , sendo inclusive, eficientes em sequestrar o mineral quelatado na ovotransferrina.

As amostras analisadas para identificação do gênero *Salmonella* foram negativas para todos os tratamentos, entretanto, no mesmo meio de cultura, foram isoladas *Pseudomonas* em ovos limpos de ninho antes da sanitização e ovos de cama após sanitização. De modo geral, as amostras negativas para isolamento de *Salmonella* spp. do conteúdo de ovos férteis demonstram indícios que o matrizeiro tem aplicado, de forma eficiente, ações de biossegurança capazes de neutralizar as contaminações das aves e ovos.

O resultado contraditório apresentado na tabela 6 apresentando isolamento de *Pseudomonas* spp. em conteúdo de ovos limpos de ninho não sanitizados e ovos de cama sanitizados pode ser explicado pela maior carga microbiana sobre a superfície da casca de ovos de cama até o momento da sanitização, com a possível penetração para o interior dos ovos, tornando processo de sanitização ineficaz. Uma segunda hipótese seria a competição interespecies da microbiota na superfície da casca antes da sanitização em ovos de cama (contado direto com a cama e excretas das aves), proporcionada principalmente pelos microrganismos Gram-positivos. Condições adversas naturais da casca para o crescimento de bactérias Gram-negativas, podem ter inibido temporariamente a multiplicação de *Pseudomonas* ao ponto de não ser possível o seu isolamento em ovos não sanitizados. Logo após a sanitização, a provável redução da microbiota Gram-positiva na superfície da casca diminuiu a competição interespecies, favorecendo o desenvolvimento, penetração e possibilidades reais de isolados deste gênero no conteúdo do ovo de cama.

O estudo da microbiota do saco vitelínico identificou o filo Firmicutes: família Staphylococcaceae, representado por 6,67% (1/15), família Enterococcaceae em 33,33% (5/15) em SVN30Min e família Enterococcaceae, representado por 13,04% (3/23) em SVC2Hs. Para o filo Proteobacteria as proporções encontradas foram: família Enterobacteriaceae identificadas em 60% (9/15) em SVN30Min, 100% (17/17) em SVN2Hs e 100% (15/15) SVC30Min, por fim, 86,96% (20/23) em SVC2Hs. A família Enterobacteriaceae apresentou predominante nas amostras, o que correspondeu a 87,14% sobre o total de famílias identificadas, enquanto as famílias Staphylococcaceae e Enterococcaceae foram representadas por 1,43% e 11,43%, respectivamente.

Os gêneros encontrados neste trabalho, para os principais grupos bacterianos identificados no saco vitelínico de pintos de 1 dia foram: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermis*, *Klebsiela pneumoniae* e *Proteus mirabilis* independente do tratamento.

Kizerwetter-Świda e Binek (2008), em estudo da microbiota do saco vitelínico de pintos neonatos encontraram a frequência de 16,66% filo Firmicutes e 83,34% filo Proteobacteria e não isolaram o filo Actinobacteria. No mesmo estudo, os autores isolaram *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. na frequência de 62,50% (15/24), 25% (6/24), 4,17% (1/24), respectivamente.

Deeming (2005) isolou *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli* em sacos vitelínicos inteiros e no conteúdo cecais de pintos de um dia na frequência de 6,6% e 3,3%, respectivamente.

A superioridade do número de amostras identificadas como Enterobacteriaceae em sacos vitelínicos de pintos de um dia do experimento pode ser associada aos transtornos inerentes às contaminações de umbigo nas primeiras semanas de vida das aves. A família é frequentemente isolada em quadros de onfalite nas primeiras semanas do alojamento, atuando como principais agentes nas contaminações do saco vitelínico e umbigo ou ambos. De forma geral, bactéria do gênero *Escherichia* é frequentemente isolada (Mejía, 2016).

O presente estudo demonstrou que pintos provenientes de ovos que foram mais expostos ao material de cama do aviário e maior intervalo para a sanitização após a coleta (120 minutos), apresentaram menor viabilidade no final do experimento. O achado indica a contaminação dos ovos entre os procedimentos de coleta e sanitização, o que pode perdurar por todo processo de incubação até o pinto recém-nascido.

No conteúdo cecal foram identificados quatro gêneros de bactérias em todos os tratamentos e duas identificações ao nível de espécies, sendo *Enterococcus faecalis* presente em todos os tratamentos e *Klebsiela pneumoniae* em CN30Min. A Microbiota dos conteúdos cecais apresentou maior frequência para gênero *Enterococcus* e, em segundo plano, *Escherichia*. A maior frequência do gênero *Enterococcus* foi apresentado em CC30Min, seguido por CC2Hs. Em contrapartida, a menor frequência foi para CN30Min e, de forma intermediária, em CN2Hs. O gênero *Bacillus* foi identificado uma vez em CN30Min e uma vez em CN2Hs e *Klebsiela* uma vez em CN2Hs. Ao comparar a frequência das espécies, *Enterococcus faecalis* sobressaiu sobre as demais, com maior prevalência em ovos de ninho.

Novamente, o gênero *Escherichia* é identificado no conteúdo cecal, reforçando a tese de contaminação antes mesmo da incubação dos ovos e demonstrando a sua capacidade em colonizar diferentes órgãos das aves durante a incubação.

Técnicas de PCR foram utilizadas com sucesso para identificação da microbiota de intestinos de pintos de um dia ao alojamento. Corroborando com o experimento, Pedroso (2005) concluiu que as aves possuem abundante e complexa comunidade de bactérias. Os isolados e classificações dos microrganismos do conteúdo cecal de pintos de um dia do atual estudo demonstram a complexidade da microbiota 24 horas após o nascimento.

Para as análises das variáveis de rendimento de incubação, os efeitos dos tratamentos tipo de ovo e momento da sanitização não afetaram a fertilidade, a eclodibilidade do número de ovos totais incubados e a eclodibilidade do número de ovos férteis totais. Além disso, a mortalidade intermediária (8 a 14), mortalidade final (15 a 21), índices de bicados vivos e bicados mortos não foram afetados pelos tratamentos.

Diferentemente dos resultados encontrados neste experimento para eclodibilidade total, Van de Brand et al. (2016) pesquisaram resultados de incubação de ovos de cama, ovos de cama lavados e ovos limpos de ninho e concluíram que a eclodibilidade dos ovos férteis provenientes da cama e cama lavado eram mais baixas que ovos limpos de ninho. Corroborando com os autores, em estudo recente, Ahamed et. al (2019) compararam a eclodibilidade de ovos limpos de ninho e ovos de cama e concluíram que ovos limpos de ninho têm maior índice de eclodibilidade do número de ovos totais incubados que ovo de cama. A explicação pode estar associada, mais uma vez, sobre a época do ano da realização do experimento, onde as temperaturas são geralmente mais amenas em comparação às estações da primavera e verão. No momento da coleta dos ovos a temperatura ambiente durante o dia variou entre 17 e 21° C.

Ainda sobre o rendimento de incubação, considerando a época do ano de realização do experimento, onde a baixa umidade relativa do ar (entre 35 e 45%) e temperaturas amenas (entre 17 e 21° C) prevaleceram, independente do momento da sanitização, ovos coletados na cama apresentaram maiores índices de contaminação em comparação aos ovos coletados nos ninhos, demonstrando o potencial de contaminação de ovos postos sobre esse material, mesmo considerando as condições ambientais descritas acima. No momento da postura, os ovos estão quentes, em função da temperatura da galinha e aparentam estar úmidos, por causa da deposição da cutícula, o que os tornam mais propensos à contaminação da casca, principalmente quando postos em ambientes com alta carga microbológica, como exemplo, a cama do aviário (Hameed et al., 2014). Associado a isto, logo após a oviposição, inicia-se

o processo de resfriamento dos ovos, com produção do fluxo natural do ar da superfície da casca para o interior do ovo através dos poros presentes na casca. Desta forma, ocorre o carreamento simultâneo de microrganismos (Scott e Swetnam, 1993). Van de Brand et al. (2016) e Ahamed et.al (2019) observaram que ovos de cama apresentam maior contaminação que ovos limpos de ninho no processo de incubação. Os resultados encontrados corroboram com os dados encontrados neste estudo.

Não houve interação entre os tratamentos para a variável contaminados. Diferentemente de épocas frias do ano, é comum nas estações quentes e chuvosas um importante aumento do índice de contaminação de ovos incubados, principalmente para aqueles postos sobre a cama. Isto se deve pela piora da qualidade do material, em resposta ao aumento do teor da umidade que, associada às altas temperaturas ambientais, propiciam o acréscimo da produção de gases, problemas locomotores e pode acelerar a multiplicação de microrganismos (Lima e Nääs, 2005; Nääs 2007). Esta realidade pode ser agravada pelo manejo da cama do aviário, das coletas e o momento da sanitização desta categoria de ovos.

A mortalidade embrionária inicial (0 a 7 dias) de ovos limpos de ninho sanitizados 30 minutos após a coleta foi afetada, sendo maior que ovos de ninho sanitizados 120 minutos. É comum, no processo de incubação, a apresentação de taxas mais altas de mortalidade embrionária inicial e final sobre a mortalidade das demais fases durante o embriodiagnóstico (Karunarathna et al. 2017), o que eleva o grau de dificuldade de interpretação. Portanto, além de fatores físicos, idade da matriz, falhas na pré-incubação, armazenamento, as leituras dos ovos não eclodidos e quebrados no embriodiagnóstico, principalmente das mortalidades precoces, podem ser consideradas as principais causas de erros na avaliação e devem ser realizadas com muito critério. Já que diferenciações importantes podem ser observadas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, o que facilitaria a determinação da morte embrionária ou do ovo infértil, como exemplo, após 48 horas de incubação, o desenvolvimento do blastoderma terá cerca de 2 a 2,5 centímetros e entre 48 e 72 horas, o anel sanguíneo estará visível, o que pode facilitar a leitura correta (Araújo e Albino, 2011), necessitando de muito treino de quem realiza as leituras. Corroborando com os resultados, Ahamed et. al (2019) relataram maior mortalidade embrionária inicial em ovos de ninho em relação a ovos de cama, entretanto, foram comparados apenas o tipo de ovo. Segundo os autores, as mortalidades precoces podem ser multifatoriais, dentre elas, inclusive, erros de interpretações no embriodiagnóstico, principalmente da fase inicial são bem comuns e afetam os diretamente os resultados.

Considerando todos os fatores estudados, a mortalidade embrionária inicial foi menor para ovos limpos de ninho sanitizados 120 minutos após a coleta em relação aos ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta. O resultado encontrado indica a real necessidade da sanitização de ovos de cama ao menor tempo possível, ou seja, respeitando o binômio tempo e sanitização, principalmente para ovos de cama. O momento adequado de sanitização de ovos incubáveis foi estudado por Araújo e Albino (2011). Os autores recomendaram a sanitização dos ovos no máximo 30 minutos após a postura, independentemente da categoria de ovo coletado. O menor tempo até a sanitização reduziu a contaminação da casca e, conseqüentemente, a entrada de microrganismos para o seu interior (Araújo e Albino, 2011). Os ovos que permanecem em ambientes sujos, como a cama do aviário, pode aumentar ainda mais a contaminação (De Reu et al. 2011).

Sobre a avaliação da qualidade do pinto de um dia, a qualidade do umbigo, percentual de pintos com abdômen volumoso, pintos eliminados, peso dos pintos de um dia em gramas, peso relativo médio do saco vitelínico e peso dos pintos sem o saco vitelínico não foram afetados pelo tipo de ovo e momento da sanitização, bem como não houve interações entre os fatores. A ausência de diferença observada entre os tratamentos para essas variáveis indica que o tipo de ovo, com qualquer um dos procedimentos de sanitização testados, não afetou esses parâmetros. A ausência de diferenças no estudo atual para essas variáveis pode estar associada à qualidade sanitária da unidade de produção de ovos férteis, às práticas adotadas na planta de incubação, bem como a data de realização do experimento. Ademais, o experimento foi conduzido em uma estação do ano com clima frio e de baixa umidade do ar que, de acordo com Graves e MacLaury (1962), inibe a proliferação microbiológica no ambiente de produção.

De acordo com Tona et al. (2004), peso ao nascimento é um indicador da qualidade dos pintos de um dia. Esta variável é afetada de forma multifatorial, ou seja, idade da matriz, qualidade da casca, peso, manejo na planta de incubação (armazenamento, perda de umidade) entre outros (Tona et al., 2001).

Contradizendo os resultados do experimento, Van de Brand et al. (2016) concluíram que ovos de cama e ovos lavados prejudicam o peso ao nascimento dos pintos de um dia em comparação aos ovos limpos de ninho.

Por fim, para os resultados de desempenho do frango de corte, os efeitos dos tratamentos, tipo de ovo e momento da sanitização não afetaram, consumo de ração, o ganho de peso e a conversão alimentar aos sete, 14, 21, 28 e 35 dias. Resultados semelhantes foram

encontrados por Van de Brand et al. (2016) quando avaliaram o efeito de ovos limpos de ninho, ovos de cama e ovos lavados sobre o desempenho do frango de corte.

Ademais, não houve interação entre os fatores e nem efeito dos tratamentos para a variável viabilidade nos períodos de 15 a 21 e 22 a 28 dias. Entretanto, ovos limpos de ninho apresentaram resultado inferior para a viabilidade do período de alojamento até os 7 dias de vida comparados aos ovos de cama, independentemente do momento da sanitização. A mortalidade durante o período experimental foi superior para os ovos limpos de ninho, o que influenciou negativamente a variável viabilidade na primeira semana de vida. Não foi possível descrever as prováveis causas dessa mortalidade, visto que não foi realizada necrópsias de aves mortas do período. Somado a isso, torna-se necessário reavaliar o número amostral utilizado para esta variável de desempenho das aves. Isto se deve, principalmente, ao reduzido número de animais utilizado em experimentos com frango de corte, ou seja, o índice de mortalidade pode afetar de forma significativa os dados estatísticos, principalmente nas primeiras semanas, onde os números estão com pouca acumulação.

Da mesma forma, houve efeito do tipo de ovo entre 8 e 14 dias para a variável viabilidade. Entretanto, diferentemente do período de 0 a 7 dias, pintos provenientes de ovos de cama que apresentaram menor viabilidade no período em relação aos pintos provenientes de ovos limpos de ninho, independentemente do momento da sanitização. As aves deste tratamento apresentavam-se apáticas e retardo no crescimento e, posteriormente vinham a óbito e, quando necropsiadas, foi possível observar quadro de septicemia bacteriana.

É comum diagnósticos laboratoriais de mortalidade de primeira semana por contaminação inicial do saco vitelínico, umbigo ou ambos, caracterizados como onfalite (Almeida et. al., 2016). O quadro pode perdurar durante toda a vida, inclusive com elevação do índice de mortalidade, baixo desempenho das aves afetadas, condenações parciais ou totais da carcaça na planta de abate. A persistência pode estar associada à gravidade do quadro, grau de lesões observadas nas necropsias, índice de mortalidade de primeira semana, uniformidade e comportamento do pinto de um dia no momento do alojamento no aviário (Padrón, 2003). De forma geral, é bem comum no campo a utilização de antibioticoterapias com a intenção de reduzir o índice de mortalidade, bem como o objetivo de melhorar os índices de viabilidade e desempenho zootécnico.

Aos 35 dias, no fim do experimento, aves provenientes de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta apresentaram índice de viabilidade inferior aos demais tratamentos. A partir do oitavo dia, aves provenientes desse tratamento apresentavam quadro de prostração e apatia e, quando vinham a óbito, apresentavam nas necropsias quadros

sugestivos de septicemia, com a presença de pericardite, peri-hepatite, aerossaculites e peritonite. Esses achados explicam o maior índice de mortalidade para esta categoria de ovo e, conseqüentemente, a influência direta na variável viabilidade durante o período experimental. Além disso, é indicativo que a categoria de ovo de cama esteve mais exposta à pressão de contaminação microbiológica no período de coleta e o momento da sanitização.

Por outro lado, frango de corte proveniente dos ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta apresentou melhor viabilidade aos 35 dias comparada ao frango de corte proveniente de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta e os números foram semelhantes ao frango de corte proveniente de ovos limpos de ninho, independentemente do momento da sanitização. Isto pode ser explicado pelo momento de sanitização aplicado neste tratamento, onde o tempo de 30 minutos entre a coleta e a sanitização foi suficiente para reduzir o índice de mortalidade aos 35 dias e, conseqüentemente, influenciou, de forma positiva o índice de mortalidade. Portanto, 30 minutos para a sanitização deste tipo de ovo após ser coletado indicou reduzir a pressão de contaminação microbiológica, com efeito positivo sobre a viabilidade do frango de corte.

O resultado para IEP, da mesma forma, foi afetado quando o frango de corte era proveniente de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a realização da coleta. O índice foi menor aos demais tratamentos, afetado principalmente pela viabilidade inferior apresentada aos 35 dias. O estudo atual elevou o risco quando aplicou a sanitização em ovos de cama 120 minutos após serem coletados, tempo suficiente para tornar a ação da fumigação ineficaz. Portanto, o tempo decorrido entre esse intervalo foi crucial para a redução da viabilidade e resultado inferior do IEP. Barnett et al. (2004) e Khabisi et al. (2012) concluíram que é possível ovos de cama, os quais possuem índices superiores de contaminação sobre a casca, em sinergia com a presença de trincas, elevar as chances de penetração dos microrganismos, antes e durante a incubação, o que pode afetar a mortalidade embrionária e o desempenho do frango de corte.

Em contrapartida, influenciada pela melhor viabilidade, o frango de corte proveniente de ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta apresentou resultado de IEP similar ao frango de corte proveniente de ovos limpos de ninho, independentemente do momento da sanitização, com destaque para a eficiência do binômio tempo e sanitização, isto porque, coletar ovos de cama associado ao menor intervalo até a sanitização demonstrou reduzir a pressão de contaminação da casca, com efeitos positivos sobre o índice de viabilidade em toda a fase de produção e, conseqüentemente, sobre o IEP.

Quando se compara a produção total de carne produzida aos 35 dias, pode-se afirmar que frangos de corte provenientes de ovos de cama sanitizados 120 minutos após a coleta produziram volumes de carne inferiores aos frangos de corte de ovos limpos de ninho, independentemente do momento da sanitização (30 minutos e 120 minutos), bem como ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta, ou seja, redução de 10,49%, 15,13% e 15,88%, respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sanitização por fumigação com paraformaldeído de ovos limpos de ninho de matrizes pesadas com 62 semanas de idade 30 minutos após a coleta quando comparado aos ovos de cama sanitizados após 30 minutos de coleta e aos ovos de ninho sanitizados após 2 horas da coleta reduz a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais e enterobactérias do conteúdo do saco vitelínico, bem como bactérias ácido-láticas do conteúdo cecal de pintos de um dia sem prejudicar a fertilidade, eclosão total, eclodibilidade, qualidade do pinto de um dia e o desempenho do frango de corte.

Ao comparar apenas os frangos de cortes proveniente de ovos de cama, a produção de carne foi superior em 15,88% para os provenientes de ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta. Assim sendo, cabe a reflexão sobre as necessidades de adequar os manejos aplicados para esta categoria de ovo nas unidades produtoras de ovos férteis, com atenção ao binômio tempo e sanitização. Agilizar a coleta dos ovos de cama, limpeza e sanitização, torna-se fundamental para atingir bons resultados.

Ademais, ovos de cama sanitizados 30 minutos após a coleta com paraformaldeído têm reduzida a mortalidade embrionária inicial (0 a 7 dias), bem como aumenta a viabilidade do frango de corte quando comparado aos ovos de ninho e de cama sanitizados após 2 horas de coleta respectivamente, principalmente pela redução do índice de mortalidade durante a fase de produção do frango de corte e, conseqüentemente, aumentando do Índice de Eficiência Produtiva (IEP).

Os resultados demonstram a importância da agilidade do procedimento de sanitização pelo método de fumigação com paraformaldeído para qualquer tipo de ovo incubável nas granjas produtoras de ovos, reforçando a preocupação com o binômio tempo e sanitização. Para ovos de cama, associado ao maior número de coletas, o manejo de sanitização torna-se ainda mais importante, pois o contato com a cama eleva a contaminação

na superfície da casca e menor tempo para esfriar os ovos, o que aumenta as chances de penetração de microrganismos para o conteúdo do ovo.

A microbiota da superfície da casca de ovos de matrizes pesadas, identificada pelo método MALDI-TOF, é heterogênea e se assemelha ao do ambiente de produção, principalmente pelas identificações, em ambas as análises, dos filos Firmicutes, Actinobactérias e Proteobacteria. Para o conteúdo do ovo, a identificação ficou restrita ao filo Proteobacteria. Já as microbiotas dos conteúdos do saco vitelínico e cecal de pintos de um dia foram identificados os filos Firmicutes e Proteobacteria. Nas análises dos suabes de cama dos aviários, superfície da casca e conteúdo do ovo de cama, bem como os conteúdos do saco vitelínico e cecal de pintos provenientes de ovos de cama foram identificadas bactérias da família Enterobacteriaceae, sendo o gênero *Escherichia* o mais abundante. Esta bactéria está associada, na maioria das vezes, ao quadro de onfalite diagnosticado em pintos de um dia em granjas comerciais de frango de corte. Portanto, ovos de cama têm maiores chances de contaminação do conteúdo do ovo e embriões logo após a postura, inclusive com real potencial de aumentar a mortalidade embrionária, além de contaminar o saco vitelínico ou umbigo, com quadro de onfalite em pintos de um dia.

Não foi possível identificar bactérias do gênero *Salmonella* no conteúdo do ovo pela metodologia MALDI-TOF. Entretanto foi possível a identificação do gênero *Pseudomonas*, bactéria responsável pela deterioração de ovos durante o processo de incubação. A não identificação de *Salmonella* indica a aplicação de um programa de biossegurança eficaz nas unidades de produção de ovos incubáveis. A identificação do gênero *Pseudomonas* reforça para a adequação do manejo de incubação deste tipo de ovo, com prioridade em segregá-lo para máquinas específicas ou incubá-los nas partes mais baixas das incubadoras, com a intenção de reduzir o grau de contaminação cruzada e assim reduzir possíveis prejuízos no desempenho das aves durante o período de criação.

Anexo I:

Tipo de ovo	BMT (UFC/ml)	ENTER (UFC/ml)	ENTERC (UFC/ml)	F/LEV (UFC/ml) *	F/LEV C (UFC/ml) *
Ninho	4,08b	2,00	2,00	2,02	2,00
Cama	6,17a	2,12	2,00	2,00	2,04
Momento do resfriamento 4° C					
30 minutos	5,35	2,12	2,00	2,20	2,00
2 horas	4,90	2,00	2,00	2,00	2,04
Valor de P					
Tipo de ovo	<0,0001	0,3370	1,0000	0,3370	0,3370
Resfriamento 4° C	0,1959	0,3370	1,0000	0,3370	0,3370
Tipo de ovo*Resfriam. 4° C	0,4929	0,3370	1,0000	0,3370	0,3370
Erro padrão da média	0,7252	0,8472	0,8488	0,8483	0,8479
CV (%)	12,95	12,12	0,00	19,05	3,72

Tabela 21. Contagem de microrganismos da superfície casca e conteúdo dos ovos limpos de ninho ou de cama refrigerado aos 30 minutos ou 120 minutos após a coleta de cama de acordo com o momento do resfriamento.

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste de Tukey (5%).

Letras maiúsculas (minúsculas) diferentes na mesma coluna (Linha) diferente pelo teste Kruskal-Wallis (5%).

BMT = contagem de bactérias mesófilas totais da superfície da casca do ovo; ENTER = contagem de enterobactérias da superfície da casca do ovo; ENTERC = contagem de enterobactérias do conteúdo do ovo; F/LEV = contagem de fungos e leveduras da superfície da casca do ovo; F/LEV C = contagem de fungos e leveduras do conteúdo do ovo.

CV = Coeficiente de variação

Os valores encontrados para a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais da superfície da casca do ovo (BMT), antes de qualquer procedimento de sanitização, variaram entre 4,08 e 6,17 log₁₀ UFC/mL para ovos limpos de ninho e ovos de cama, respectivamente. Ovos de ninho, independentemente do momento que foram resfriados, obtiveram a BMT significativamente inferior aos ovos de cama, o que já era esperado para esta categoria de ovo, por serem postos em ambiente mais limpo e sistematicamente sanitizado. Ovos limpos de ninho percorrem as esteiras coletoras dos ninhos automáticos durante as coletas sem contato direto com as aves, excretas e material da cama. De forma diferente, ovos postos na cama do aviário têm contato direto com excretas das aves, umidade da cama e do ambiente e esfriam em menor tempo, carreando mais microrganismos para o seu interior em intervalo menor. Araújo e Albino (2011) recomendaram a sanitização de ovos férteis no máximo 30 minutos após a postura, o que pode contribuir para a redução na contaminação da casca e, consequentemente, favorecer a redução de entrada dos microrganismos para o interior do ovo.

Berrang et al. (1997), em estudo comparativo da microbiologia da superfície da casca de ovos férteis antes da sanitização entre ovos classificados como ovos limpos de ninho e sujos durante todo o período de produção, encontraram contagem superior das populações

de bactérias mesófilas aeróbicas totais na superfície da casca do ovo classificado como sujo, o que está de acordo com os achados nesta avaliação do quadro sanitário da granja, aonde os valores encontrados para ovos limpos de ninho e ovos sujos foram de 4,08 e 6,17 log₁₀ UFC/ovo, respectivamente.

Da mesma foram, em pesquisa com desinfetantes alternativos (formaldeído, ozônio, Irradiação de luz UV-C, peróxido de hidrogênio, ácido peracético) para ovos férteis limpos de ninho, Clímaco et al. (2018) encontraram valores entre 3,17 e 3,57 log¹⁰ UFC/mL da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais da superfície da casca, antes de qualquer procedimento de sanitização, bem inferior aos ovos de cama avaliados neste trabalho.

Para as contagens de ENTER e F/LEV da superfície da casca e conteúdo do ovo antes da sanitização não houve efeito do tipo de ovo e nem interação entre os parâmetros comparados. Fasenko et al. (2009) não observaram crescimento de enterobactérias na superfície da casca do ovo, independentemente se foram ou não sanitizados. Contudo, os resultados apresentados neste experimento foram semelhantes aos de Musgrove et al. (2014), ou seja, contagens baixas de enterobactérias nos dois tipos de ovos avaliados, até mesmo antes de sanitizá-los, o que pode ser caracterizado como baixa precisão de contagem dos microrganismos por placa (Corry et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. M. S.; ARAÚJO, A.R.; ANDRADE, L. M. A. Associação dos quadros anatomopatológicos de colibacilose aviária com genes de virulência de *Escherichia coli*. *Veterinária em Foco*. Canoas, v. 13, n. 2, p. 113–131, 2016.
- ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L. F. T. *Incubação Comercial*. 1. ed. Viçosa - MG: Transworld Research Network, 2011. 171p.
- BARON, F.; NAU, Françoise; GUÉRIN-DUBIARD, Catherine; BONNASSIE, Sylvie; GAUTIER, Michel; ANDREWS, Simon C.; JAN, Sophie. Egg white versus *Salmonella* Enteritidis! A harsh medium meets a resilient pathogen. *Food Microbiology*, [S.L.], v. 53, p. 82-93, fev. 2016.
- BARNETT, D. M.; KAMPULA, B. L.; PETRYK, R. L.; ROBINSON, N. A.; RENEMA R. A.; ROBINSON, F. E. Hatchability and early chick growth potential of broiler breeder eggs with hairline cracks. *J. Appl. Poult. Res.* n. 3, p. 65–70, 2004.

BERRANG, M. E.; Frank, J. F.; Buhr, R. J.; BAILEY, J.S.; COX, N. A.; MAULDIN, J.M. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the eggs reproduction period. *Poultry Sci.*, Res. 6, p. 298–305, 1997.

BOARD, R. G.; TRANTER, H. S. The microbiology of eggs. In: STALDEMAN W. J.; Cotterill, O. J. *Egg Science and Technology*. 4th. Binghamton: Food Products, 1995. p. 81–104.

BRAKE, J.; WALSH, T. J. J. R. BENTON, C. E.; PETITTE, J. N.; MEIJERHOF, R.; PEÑALVA, G. Egg handling and storage. *Poultry Sci.*, v. 76, p. 144–151, 1997.

BRUCE, J.; DRYSDALE, E. M. Trans-shell transmission. In: BOARD, R. G.; FULLER, R (Eds.). *Microbiology of the avian egg*. London: Chapman & Hall, 1994. P. 63–91.

CLÍMACO, W. L. S.; MELO, E. F.; VAZ, D. P. et al. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v. 53, n. 10, p. 1177–1183, 2018.

COBB VANTRESS. *Suplemento de nutrição e desempenho do frango de corte*. 2018. Disponível em:

<<https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/99b0cf062c/61bd2490-56d1-11e9-bfbd-7963ec6b06e5.pdf>>

CORRY, J. E. L.; JARVIS, B.; PASSMORE, HEDGES S.E., A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. *Food Microbiol.* v. 24, p. 230–253, 2007.

CORTÉS, C. R., ISAÍAS, G. T., CUELLO, C. L. et al. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 46, n.1-2, p. 12-16, 2004.

DECUYPERE E.; BRUGGEMAN, V. The Endocrine Interface of Environmental and Egg Factors Affecting Chick Quality. *Poultry Sci.*, v. 86, p. 1037–1042. 2007.

DEEMING, D.C. Yolk sac, body dimensions and hatchling quality of ducklings, chicks and poults. *British Poultry Sci.* Welton - Lincoln, v. 46, n. 5, p. 560-564, 2005.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRIKX, M. et al. Bacterial eggs hell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for lay inghens. *Brit. Poult. Sci.*, v.46, n.2, p.149-155, 2005.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W.; HEYNDRIKX, A.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L.; Eggs hell factors influencing eggs hell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Jounal Food Microbiol*, v. 112, p. 253–260, 2006.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; HEYNDRIKX, M.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J.; HERMAN, L. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens *Br. Poult. Sci.*, v. 47, p. 163–172, 2011.

DRYSDALE, E. M. *Microbial penetration of the avian egg*. 1995. 250f. Tese (Doutorado). University of Glasgow. Glasgow.

EFSA. European Food Safety Authority (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) related to the Microbiological risks on washing of Table Eggs. *The EFSA Journal*. v. 269, p. 1- 39, 2005.

FASENKO, G. M.; O'DEA CHRISTOPHER, E. E., MCMULLEN, L. M. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.*, v. 88, p.1121–1127, 2009.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; GAST, R.; HUMPHREY, T.J.; van IMMERSEEL, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol Rev*, v. 33, n. 4, p. 718–38, 2009.

GRAVES, R. C.; MACLAURY, D. W. The effect of temperature, vapour pressure and absolute humidity on bacterial contamination of shell eggs. *Poultry Sci.*, v. 4, p. 1219–1225, 1962.

HAMEED, U.; AKRAM, W.; ANJUM, M. S. Effect of *Salmonella* on Hatchability and Fertility in Laying Hen, an Assessment. *Veterinaria*, v. 2, p. 20–23, 2014.

KHABISI, M. M.; SALAH A.; S. N. MOUSAVI. The influence of egg shell crack types on hatchability and chick quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36 (3), p. 289–295, 2012.

KARUNARATHNA, R.; POPOWICH, S.; WAWRYK, M. et al. Increased Incidence of Enterococcal Infection in Nonviable Broiler Chicken Embryos in Western Canadian

Hatcheries as Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Avian Diseases*, v.61, n. 4, p.472-480, 2017.

KIZERWETTER-ŚWIDA, M.; BINEK, M. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v. 17, p. 224–232, 2008,

LIMA, A. M. C.; NAAS, I. A. Evaluating two systems of poultry production: conventional and free-range. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v. 7, n. 4, p. 215–220, 2005.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V. et al. *Microbiologia de Brock*. 12ed. Porto Alegre:Artmed, 2010. 1160p.

MAGWOOD, S. E. Studies in hatchery sanitation I. Fluctuations in microbial counts of air in poultry hatcheries. *Poult. Sci.*, v. 43, p. 441–449, 1964.

MAULDIN, J.M. Reducing contamination of hatching eggs. *Poult. Dig.*, v. 57, p. 38-44, 1999.

MEJÍA, B. (8 de Febrero de 2016). *Onfalitis y deficiente cicatrización umbilical*. Disponível em: <http://patologiaaviarmediagnostico.blogspot.com/2016/02/onfalitis-y-deficiente-cicatrizacion.html>.

MUSGROVE, M. T.; STEPHENS, C. B.; BOURASSA, D. V. et al. Enterobacteriaceae and Salmonella recovered from non sanitized and sanitized broiler hatching eggs. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 23, p. 516-522, 2014.

NÄÄS, I. A.; MIRAGLIOTA, M. Y.; BARACHO, M. S.; MOURA, D. J.; SALGADO, D. D. Qualidade da cama de frango em aviário convencional e em tipo túnel. *BioEng.*, v.1, n. 2, p. 103-115, 2007.

NORTH, M. O.; BELL, D. D. Factors affecting hatchability. In: *Commercial chicken production manual*. New York: Chapman & Hall, p.103-134, 1990.

PADRÓN, M. Herramientas para evaluar la calidad del pollito. 2003. Aviagen: <<http://avicol.co/descargas2/Herramientasparaauditarlacalidaddeunpollito.pdf>>. Acesso em: 17 de mai de 2021

PEDROSO A. A., MENTEN, J. F. M., LAMBAIS, M. R. The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *Journal Of Applied Poultry Research*, v. 14, p.232–237, 2005.

SANDER, J. E.; WILSON, J. L. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. *Avian Dis.*, v. 43, p. 227–233, 1999.

SCOTT, T. A.; SWETNAM, C. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs. II. Effectiveness against microorganisms on the egg shell. *Journal Applied Poultry Research*, v.2, p.7–11, 1993.

TONA, K.; BAMELIS, F.; COUCKE, W. et al. Relationship between broiler breeder's age and egg weight loss and embryonic mortality during incubation in large-scale conditions. *Journal of Applied Poultry Research*, v.10, p. 221–227, 2001.

TONA, K.; ONAGBESAN, O.; KETELAERE, B.; DECUYPERE, E.; BRUGGEMAN, V. Effects of age of broiler breeders on egg quality, hatchability, chick quality chick weight and chick post-hatch growth to 24 days. *The Journal of Applied Poultry Research*. v. 13, p. 10–18, 2004.

THORNS, C. J. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 19 (1), 226–239, 2000.

VAN DEN BRAND, H.; SOSEF, M.P.; LOURENS, A. et al. Effects of floor eggs on hatchability and later life performance in broiler chickens. *Poultry Sci.*, v. 95, p. 1025–1032, 2016.