

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**Métodos para desinfecção de ovos férteis e caracterização de sua
microbiota**

Érica de Faria Melo

BELO HORIZONTE

2019

Érica de Faria Melo

Métodos para desinfecção de ovos de matrizes pesadas

Tese 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 Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal/Não Ruminantes

Orientador: Prof. Leonardo José Camargos Lara
Coorientadores: Prof^a. Vanessa Michalsky Barbosa
Prof^a. Mariana André Pompeu

M528m Melo, Érica de Faria, 1987-

Métodos para desinfecção de ovos férteis e caracterização de sua microbiota [manuscrito] / Érica de Faria Melo. - 2019.

97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Leonardo José Camargos Lara.

Coorientadores: Vanessa Michalsky Barbosa, Mariana André Pompeu

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

1. Desinfecção - Teses. 2. Ácido peracético. 3. Ovos - Eclodibilidade - Teses. 4. Bacteria - Isolamento e purificação. 5. x. I. Lara, Leonardo José Camargos. II. Barbosa, Vanessa Michalsky. III. Pompeu, Mariana André. IV Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD: 637.5

Tese defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2019 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara

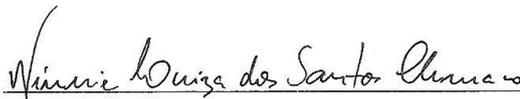
(Orientador)



Prof. Dr. Itallo Conrado Sousa de Araújo



Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza



Dra Winnie Luíza dos Santos Clímaco



Prof. Dr. Jeerley Moreira

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	14
1. Formação do ovo	14
1.1. Formação da gema	14
1.2. Formação do albúmen	15
1.3. Formação da casca	16
1.4. Composição do ovo	18
1.5. Compostos antimicrobianos presentes no ovo	19
2. Microbiologia da casca do ovo	21
3. Desinfecção de ovos férteis	28
3.1. Formaldeído	30
3.2. UV-C	32
3.3. Ozônio	34
3.4. Peróxido de hidrogênio	36
3.5. Ácido peracético	37
4. Aplicação da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de bactérias	40
4.1. Princípio da técnica	40
4.2. Aplicação da técnica MALDI-TOF MS na avicultura	42
5. Referências bibliográficas	45
CAPÍTULO II – AN EVALUATION OF ALTERNATIVE METHODS FOR SANITIZING HATCHING EGGS	52
Abstract	52
Introduction	53
Material and Methods	54
Results and Discussion	61
Acknowledgments	71
References	71
CAPÍTULO III – EFFECT OF DISINFECTION OF HATCHING EGGS ON EGGSHELL AND YOLK SAC MICROBIOTA	76

Abstract -----	76
Introduction -----	77
Material and Methods -----	78
Results and Discussion -----	83
Acknowledgments -----	91
References -----	91
CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Composição química do ovo de galinha -----	19
Tabela 2. Composição aproximada da microbiota obtida por lavagem da casca do ovo ---	22
Tabela 3. Tipos de micro-organismos presentes na casca de ovos de galinhas -----	23
Tabela 4. Alterações ocorridas em ovos infectados com culturas bacterianas puras -----	25

CAPÍTULO II – AN EVALUATION OF ALTERNATIVE METHODS FOR SANITIZING HATCHING EGGS

Table 1. Counts of total aerobic microorganisms, Enterobacteriaceae and molds and yeasts on eggshell surface according to disinfection processes -----	62
Table 2. Eggshell thickness and strength of eggs submitted to different disinfection processes-----	64
Table 3. Egg weight before setting and during transfer, and percentage of egg weight loss, for eggs submitted to different disinfection processes -----	66
Table 4. Percentage of total hatchability, hatchability of fertile eggs, embryonic mortality and, contaminated eggs for eggs submitted to different disinfection processes -----	67
Table 5. Chick weight, percentage of salable chicks, total aerobic microorganisms and <i>Enterobacteriaceae</i> counts in yolk sac according to disinfection processes -----	69

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. Amostras de ovos contaminados encontrados no momento do embriodiagnóstico --
----- 26
- Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do MALDI-TOF MS
----- 42

CAPÍTULO II – AN EVALUATION OF ALTERNATIVE METHODS FOR SANITIZING HATCHING EGGS

- Figure 1. Diagram of custom-built chamber with 16 germicidal UV-C lamps ----- 56

CAPÍTULO III – EFFECT OF DISINFECTION OF HATCHING EGGS ON EGGSHELL AND YOLK SAC MICROBIOTA

- Figure 1. The relative frequency of phylos in eggshell microbiota according to the treatments
----- 83
- Figure 2. The relative frequency of genera in eggshell microbiota according to the treatments
----- 85
- Figure 3. The relative frequency of phylos in yolk sac of newly hatched chicks according to
the treatments ----- 87
- Figure 4. The relative frequency of genera in yolk sac of newly hatched chicks according to
the treatments ----- 88

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes procedimentos de desinfecção alternativos à fumigação com formaldeído sobre a enumeração e isolamento de micro-organismos da superfície casca do ovo, qualidade da casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e a enumeração e isolamento de micro-organismos do saco vitelínico de pintos de um dia. Um total de 10.080 ovos férteis de matrizes pesadas de 70 semanas de idade da linhagem Cobb, coletados diretamente dos ninhos, foram distribuídos de forma aleatória em delineamento em blocos ao acaso, onde a coleta foi considerada o bloco, entre os seguintes tratamentos: fumigação com paraformaldeído (4,68g/m³/30 min; FF), fumigação com ozônio (5-15ppm/30 min; FO), irradiação de luz UV-C (254nm; 8,09 mW/cm²; 120s; UV-C), pulverização com peróxido de hidrogênio (3%; 0,69ml/ovo; H₂O₂), pulverização com ácido peracético (0,3%; 0,69ml/ovo; PAA), pulverização com água (0,69ml/ovo; controle úmido; CU) e sem desinfecção (controle seco; CS). Oito amostras compostas de quatro ovos cada foram coletadas para contagem de micro-organismos aeróbicos totais, Enterobacteriaceae e bolores e leveduras presentes na casca dos ovos após a desinfecção em cada tratamento. Um total de 28 ovos por grupo foi coletado para avaliações da espessura e resistência da casca. Ao todo, 924 ovos de cada tratamento foram incubados, em 12 bandejas de 77 ovos cada, para avaliação dos percentuais de perda de peso dos ovos durante a incubação, eclodibilidade, eclodibilidade de ovos férteis, mortalidade embrionária (inicial, intermediária e final), peso dos pintos e percentual de pintos vendáveis ao nascimento. A avaliação das contagens de micro-organismos aeróbicos totais e Enterobacteriaceae no saco vitelínico foram realizadas em 13 pintos de um dia de idade, oriundos de cada tratamento. Utilizou-se metodologia dependente de cultivo para a enumeração e o isolamento dos micro-organismos da casca do ovo e do saco vitelínico de pintos de um dia de idade, seguida de identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os ovos dos grupos desinfetados com ácido peracético e UV-C apresentaram redução significativa ($p=0,002$) das contagens de micro-organismos aeróbicos totais quando comparados ao grupo controle seco. A contagem de Enterobacteriaceae foi menor ($p<0,05$) para os ovos desinfetados com ácido peracético quando comparado aos grupos controles. Com relação à contagem de bolores e leveduras, não foi encontrada diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos. As demais variáveis de qualidade de casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos e contagem bacteriana

do saco vitelínico 24 horas após o nascimento não foram afetadas pelos tratamentos ($p > 0,05$). O filo Proteobacteria foi dominante tanto na superfície da casca do ovo quanto no saco vitelínico. Foram identificados 19 gêneros de bactérias na superfície da casca e o gênero *Staphylococcus* (18%) apresentou maior frequência relativa. No saco vitelínico, 12 gêneros de bactérias foram isolados e identificados, sendo a bactéria do gênero *Escherichia* (32,6%) a de maior frequência relativa. Por reduzir a contagem microbiana na casca dos ovos, não prejudicar a eclodibilidade e a qualidade da casca, o ácido peracético e a luz UV-C podem ser recomendados para desinfecção de ovos férteis.

Palavras-chave: ácido peracético, eclodibilidade, enumeração e isolamento de bactérias, MALDI TOF, UV-C

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different disinfection procedures alternative to fumigation with formaldehyde on the enumeration and isolation of eggshell surface microorganisms, eggshell quality, hatching parameters, neonate chick quality and enumeration and isolation of microorganisms of the yolk sac of day-old chicks. A total of 10,080 hatching eggs were collected from a 70-wk-old commercial broiler breeder flock and distributed in a completely randomized block design with seven treatments: fumigation with paraformaldehyde (5.03g/m³/30 min; FF), fumigation with ozone (5-15ppm/30 min; FO), ultraviolet light-C irradiation (8.09 mW/cm²; 120 s; UV-C), hydrogen peroxide spraying (3%; 0.69 mL/egg; H₂O₂), peracetic acid spraying (0.3%; 0.69mL/egg; PAA), water spraying (0.69mL/egg; water control - WC), and without disinfection (dry control - DC). Eight samples (pool of four eggs each one) from each treatment were collected to enumerate the presence of Enterobacteriaceae, total aerobic microorganisms, and mold and yeasts on the eggshell after the disinfection procedure. A total of 28 eggs per group were collected to evaluate the eggshell strength and thickness. A total of 924 eggs per treatment were placed in twelve 77-egg trays to evaluate eggs weight loss during incubation, hatchability, hatchability of fertile eggs, embryo mortality (initial, middle, and late), chick weight and percentage of saleable chicks at hatching. The counts of Enterobacteriaceae and total aerobic microorganisms present in the yolk sac were performed in thirteen day-old chicks originated from each treatment. Culture-dependent methodology was carried out for enumeration and isolation of the microorganisms on eggshell surface and yolk sac in one-day-old chicks, followed by identification by mass spectrometry (MALDI-TOF). Spraying eggs with PAA and UV-C significantly reduced aerobic microorganisms plate counts compared to the DC group. In addition, eggs disinfected with PAA had lower Enterobacteriaceae counts than those from DC and WC groups. Eggshell quality, incubation parameters, chick quality, and microbiological counts for yolk sac did not differ ($p>0.05$) among treatments. The Proteobacteria phylum was dominant either on eggshell surface or in the yolk sac. Nineteen genera of bacteria were identified on eggshell surface and the genus *Staphylococcus* (18%) had the highest relative frequency. In the yolk sac, 12 genera of bacteria were identified and the bacterium of the genus *Escherichia* (32.6%) had the highest relative frequency. This

study demonstrated the potential for the application of PAA and UV-C for eggshell disinfection.

Key-words: bacterial enumeration and isolation, hatchability, MALDI TOF, peracetic acid, UV-C

INTRODUÇÃO

A obtenção de um alto rendimento de incubação e de pintinhos de qualidade são alguns dos objetivos principais do sistema produtivo de frangos de corte quando se almeja boa produtividade e rentabilidade. No entanto, a contaminação do ovo fértil por micro-organismos após a postura é capaz de afetar negativamente o sucesso desse processo.

Micro-organismos podem penetrar o ovo fértil e contaminar não somente um único embrião, mas diversos outros ovos e/ou pintinhos durante o processo de incubação e/ou nascimento. Essa fonte de contaminação pode ser levada para a granja de destino das aves e representar um risco significativo para a segurança do alimento (Berrang *et al.*, 1999). Além disso, a contaminação do ovo pode comprometer a eclodibilidade ou promover o nascimento de pintos de baixa qualidade, que possuem pior desempenho e são considerados uma das principais causas de mortalidade na primeira semana de vida das aves.

A elaboração de um eficiente programa de biosseguridade pode minimizar o nascimento de pintos de baixa qualidade. Fassenko *et al.* (2009) afirmaram que a redução da contaminação microbiana na casca do ovo auxilia na diminuição da infecção bacteriana de embriões em desenvolvimento e em pintinhos neonatos, o que demonstra a importância da desinfecção dos ovos. De acordo com Bailey *et al.* (2001), a necessidade de se realizar a desinfecção de ovos férteis é relatada desde 1908, quando utilizou-se a fumigação com formaldeído para o controle da população microbiana, prática ainda realizada nas granjas.

No entanto, desde que a *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) reconheceu o potencial carcinogênico do formaldeído e, em 1991, publicou um regulamento reduzindo o nível de exposição admissível do trabalhador para o formaldeído de 1 ppm para 0,75 ppm, para a média ponderada de 8 horas, a indústria avícola empenha-se na busca por desinfetantes alternativos.

Além disso, estudos científicos sobre a diversidade da microbiota da casca do ovo na literatura científica são escassos (Haines, 1938; Board e Tranter, 1995 e Olsen *et al.*, 2017). Conhecer os principais micro-organismos presentes na casca do ovo é extremamente importante, tendo em vista que, cada desinfetante possui um modo de ação que pode ser mais eficiente sobre determinado grupo de micro-organismos. Os

métodos tradicionais para identificação de bactérias envolvem o cultivo e isolamento em meios seletivos seguido de testes bioquímicos, o que torna o processo longo e menos preciso (Carbonelle *et al.*, 2011). Portanto, o estudo de novas técnicas de identificação que sejam mais rápidas e baratas torna-se relevante.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da desinfecção de ovos férteis de matrizes velhas com formaldeído e outros procedimentos alternativos de desinfecção (gás ozônio, radiação de luz UV, pulverização com peróxido de hidrogênio e ácido peracético) sobre a contagem microbiana da casca, qualidade da casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e contaminação microbiana do saco vitelínico de pintos de um dia de idade. Além disso, este trabalho também objetivou identificar a comunidade bacteriana da superfície da casca do ovo e do saco vitelínico de pintos 24 horas após o nascimento, utilizando-se metodologia dependente de cultivo, seguida de identificação por espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS).

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

1. Formação do ovo

O ovo é a fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião. A casca permite a troca de gases e de água com o ambiente e fornece proteção ao embrião contra agentes físicos e microbianos.

O ovo da galinha consiste de uma célula reprodutiva (disco germinativo) muito semelhante àquela encontrada nos mamíferos. Contudo, a célula é localizada na superfície da gema e cercada pelo albúmen, membranas da casca, casca e cutícula. O sistema reprodutivo da galinha é composto pelo ovário e oviduto. Porém, somente o ovário e oviduto esquerdo são desenvolvidos e funcionais. O ovário é responsável pela formação da gema e o oviduto pelas demais partes do ovo. O tempo necessário para formação do ovo varia de 23 a 26 horas (Bell, 2001; Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

As galinhas botam ovos sucessivamente ao longo dos dias, fato esse denominado como sequência de postura. A sequência de postura é muito variável, mas normalmente, aves de postura podem botar 50 ovos sucessivamente durante o primeiro ciclo de produção. Após o término da sequência, a galinha não irá ovular por um ou mais dias e, então, outra sequência se inicia (Bell, 2001). De acordo com Presinger (2018), os geneticistas têm desenvolvido programas de melhoramento cujo principal objetivo é aumentar o número de ovos/ave alojada, com isso as sequências de postura têm tornado-se maiores. Presinger (2018) afirma que é esperado um aumento anual de dois a três ovos por ave em um ciclo de produção de 13 meses. Essas galinhas têm se tornado tão produtivas que o autor apresenta o resultado de um estudo no qual 1.613 poedeiras foram avaliadas individualmente durante 82 semanas de produção (21 a 102 semanas de idade). Ao longo de 515 dias foram observadas várias sequências de postura cujo intervalo (período sem ovo) entre essas sequências foi em média de apenas um a dois dias. Contudo, a duração da sequência de postura foi muito variável entre uma sequência e outra e 180 dias foi o tempo máximo que uma galinha permaneceu em postura.

1.1. Formação da gema

No ovário ocorre a formação das células germinativas primordiais que, posteriormente, são transformadas em oócitos. Cada oócito torna-se um folículo com o

desenvolvimento das camadas da granulosa e da teca. Os constituintes da gema são produzidos no fígado pela ação do estrogênio e transportados via corrente sanguínea para os folículos (Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

A gema não é a célula reprodutiva em si, mas é a fonte de alimento para sustentar o crescimento e o desenvolvimento do embrião. Quando a ave atinge a maturidade sexual, o ovário e o oviduto passam por várias mudanças. O hormônio folículo estimulante (FSH), produzido pela adeno-hipófise, é responsável pelo aumento dos folículos ovarianos. Cerca de cinco a dez folículos crescem em uma hierarquia, sendo necessários aproximadamente dez dias para uma gema completar seu crescimento. Quando o folículo atinge maturidade, a progesterona produzida pelo ovário faz com que o hipotálamo estimule a adeno-hipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH), responsável pela ovulação (Bell, 2001).

Após a ovulação, o infundíbulo capta a gema onde provavelmente ela adquire a membrana perivitelínica, sendo 15 minutos o tempo de percurso por essa região, aproximadamente. Em seguida, a gema segue para o magno para a formação do albúmen (Bell, 2001; Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

1.2. Formação do albúmen

O albúmen é produzido na região do oviduto denominada magno e o tempo total gasto para sua formação é de aproximadamente três horas. O albúmen é dividido em quatro regiões: o albúmen fluido externo, o albúmen denso, o albúmen fluido interno e a chalaza. Os compostos com atividade antimicrobiana encontrados no albúmen (lisozima, avidina e conalbumina) concentram-se no albúmen denso. A chalaza tem a função de manter a gema centralizada, o que impede a aderência do embrião na casca permitindo seu desenvolvimento. Os albumenes fluidos externo e interno possuem pouca atividade antibacteriana e essa atividade estaria relacionada ao pH, não ideal para o desenvolvimento bacteriano. No ovo recém-posto, o pH do albúmen varia de 7,4 a 8,2 e, com o avançar do período de armazenamento, ele rapidamente aumenta para 9,0 a 9,5 devido à perda de gás carbônico para o ambiente (Haines, 1938; Baker 1974; Lapão *et al.*, 1999; Silversides e Scott 2001; Barbosa, 2011).

1.3. Formação da casca

O processo cíclico de formação da casca inicia sete horas após a ovulação, quando aumenta o transporte e a secreção de cálcio no útero e termina duas horas antes da postura. O processo é finalizado quando são liberadas a progesterona e a prostaglandina. A progesterona diminui a expressão de RNAm para calbidina e finaliza o processo de calcificação e a prostaglandina promove a oviposição (Ito *et al.*, 2013).

A estrutura da casca é ordenada e dividida em camadas, resultando em uma deposição sequencial de fração orgânica e mineral. A fração orgânica corresponde a 3,5% da casca e consiste nas membranas da casca, nos sítios mamilares de nucleação e na cutícula (matriz orgânica da casca). As membranas da casca são formadas no istmo (porção mais estreita do oviduto, cujo tempo de passagem do ovo é de aproximadamente 75 minutos). A porção inorgânica corresponde a 96,5% da casca e consiste nas camadas: mamilar, paliçada e de cristal vertical. Ela é formada no útero (processo que dura em torno de 20 horas) e o seu principal componente é a calcita – uma das três formas do carbonato de cálcio e o restante carbonato de magnésio e fósforo tricálcico (Barbosa, 2011; Ito *et al.*, 2013).

O íon carbonato que compõe o carbonato de cálcio deriva do bicarbonato plasmático ou de uma reação química mediada pela anidrase carbônica. A formação do íon carbonato, a partir de CO₂ e H₂O, é mediada pela enzima anidrase carbônica, encontrada na mucosa do útero da galinha. A expressão da anidrase carbônica no útero é modulada por esteróides, e é mais elevada durante a produção sendo inexpressiva durante a muda. O hidrogênio (H⁺) liberado pela ação catalítica da anidrase carbônica induz a acidose metabólica e estimula a solubilização do cálcio na moela e intestino e, conseqüentemente, estimula a expressão de mRNA para calbindina (intestino, útero e rins) durante o ciclo circadiano de síntese da casca. A calbindina facilita a absorção de cálcio. Em poedeiras que recebem níveis adequados de cálcio e fósforo pela dieta, o cálcio utilizado para formação da casca é proveniente predominantemente da absorção intestinal (Baião e Lúcio, 2005; Ito *et al.*, 2013).

Muitos fatores podem afetar a mineralização e a qualidade da casca do ovo, dentre eles podem ser citados: genética, ambiente, nutrição, *status* sanitário e idade da galinha (Swiatkiewicz *et al.*, 2015).

Diferentes linhagens de galinhas apresentam qualidades de casca distintas devido às diferenças na capacidade de transporte e utilização de nutrientes, podendo,

desta forma, influenciar na qualidade da casca (Rezende e Rocha 2013). A seleção genética para qualidade do ovo se baseia fundamentalmente na espessura da casca, que tem uma herdabilidade aproximada de 40%. No entanto, a seleção para qualidade da casca é inversamente proporcional à produtividade (Baião e Cançado, 1997).

A qualidade da casca do ovo pode ser alterada em lotes submetidos à alta temperatura ambiente. A alta temperatura reduz a ingestão de ração, que pode resultar em redução do peso corporal, da produção, do tamanho e qualidade dos ovos (Rezende e Rocha, 2013).

Baião e Cançado (1997) afirmaram que as enfermidades que alteram o metabolismo ou provocam lesões principalmente no intestino delgado, rins e útero, todos envolvidos no processo de formação da casca, direta ou indiretamente, podem também prejudicar a sua formação.

Ainda de acordo com Tumova e Goust (2012), a gravidade específica da casca do ovo diminui com o aumento da idade da galinha devido à redução da espessura e da densidade da casca.

A cutícula é um complexo orgânico lubrificante presente na superfície mineral da parte externa da casca. Ela é depositada pelas células epiteliais que revestem o útero da galinha durante a última uma hora e meia antes da oviposição. Ela é constituída por proteínas (principalmente glicoproteínas, 85 a 90%) associadas a uma porção de polissacarídeos (4%), lipídios (3%) e, no caso de ovos com casca marrom, pigmentos de porfirina. Além disso, possui espessura variável (até 12 μm) e uma distribuição desigual na superfície da casca do ovo. A análise de raios X de energia dispersiva da cutícula demonstrou que há fósforo e magnésio presentes nela. A maior parte do fósforo encontrado estava na forma de fosfato não cristalino, provavelmente como fosfoproteína (Barbosa, 2011; Navarro *et al.*, 2013).

O pigmento que confere a cor marrom à casca é a ooporfirina, uma mistura de protoporfirina e coproporfirina secretada pelas células epiteliais uterinas. Não se sabe onde o pigmento é sintetizado, possivelmente na célula epitelial do útero. Ele é secretado junto com a matriz da casca e cutícula, nas últimas cinco horas do processo de formação da casca (Ito *et al.*, 2013).

A vagina é a última porção do oviduto e é conectada a cloaca. Ela é responsável pela passagem do ovo para a cloaca e deposição da cutícula (Barbosa, 2011).

1.4. Composição do ovo

As proporções de gema, albúmen e casca encontradas no ovo são: 27,5 a 30%, 60 a 63% e 9 a 10%, respectivamente. Os principais componentes do ovo são: água (75%), proteínas (12%), lipídios (12%) sendo o restante constituído por carboidratos, minerais e vitaminas (Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

A gema é composta principalmente por lipídios (aproximadamente 65% da matéria seca). Desses lipídios, 65% são triglicerídios, 29% fosfolipídios e, aproximadamente, 5% colesterol (Anton *et al.*, 2006). Os lipídios e demais constituintes da gema são sintetizados no fígado pela ação do estrógeno e transportados ao sistema reprodutivo. Os lipídios são transportados pelas lipoproteínas (Bell, 2001).

As proteínas do albúmen são basicamente sintetizadas por células tubulares glandulares distribuídas ao longo da parede do oviduto (magno). A biossíntese das proteínas é iniciada após um estímulo hormonal. O estrogênio, hormônio responsável por esse estímulo, induz a um aumento da expressão do mRNA para produção de ovalbumina. A ovalbumina é a principal proteína do albúmen, compreendendo 50% da proteína total. Funcionalmente, ela é importante para gelificação, formação de espuma e propriedades emulsificantes da clara do ovo. A ovomucina, outra proteína do albúmen (3,5%), é responsável pela viscosidade (Mine e Kovacs-Nolan, 2004; Wellman-Labadie *et al.*, 2007). Na tabela 1 são apresentados os constituintes dos ovos e sua composição química.

Tabela 1. Composição química do ovo de galinha

Constituinte	% (p/v) ¹	Principais componentes (% relativa, p/p) ²	
Casca	9 - 10	Sais inorgânicos (96,5)	Carbonato de cálcio (98,4) Fosfato tricálcico (0,8) Carbonato de magnésio (0,8)
		Fração orgânica (3,5)	
Albúmen	60-63	Proteína (9,7-10,6)	Ovoalbumina (54) Ovotransferrina (12) Ovomucóide (11) Ovomucina (3,5) Lisozima (3,5)
		Carboidratos (0,4-0,9)	
		Lipídios (0,03)	
		Cinzas (0,5-0,6)	
Gema	27,5-30	Lipídios (32-35)	Triglicerídios (66) Fosfolipídios (29) Colesterol (5,0)
		Proteínas (15-16,6)	Apovitelina (37) Fosvitina (13,4)
		Carboidratos (0,2-1)	
		Cinzas (1,1)	

Fonte: Adaptado de Kovacs-Nolan, 2004; Anton *et al.*, 2006.

¹ Porcentagem em massa/volume (p/v)

² Porcentagem em massa (p/p)

1.5. Compostos antimicrobianos presentes no ovo

O ovo apresenta uma série de barreiras complexas defensivas contra os micro-organismos invasores. Os micro-organismos diferem entre si em sua habilidade de escapar dos mecanismos de defesa do ovo, tornando-se capazes de multiplicar em seus diferentes constituintes do ovo (Mine *et al.*, 2003).

A casca do ovo é a primeira barreira física contra a penetração de micro-organismos. A cutícula, constituinte mais externo da casca, previne a entrada de micro-organismos ao vedar parcialmente os poros da casca. Contudo, ela permite a troca de gases e evita a perda excessiva de umidade do ovo, fatores importantes para o desenvolvimento do embrião (Barbosa, 2011). De acordo com Mine *et al.* (2003), a fração solúvel da matriz proteica da casca possui atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aureginosa*.

A lisozima é uma enzima presente no albúmen que atua promovendo a hidrólise das ligações glicosídicas β 1,4 entre resíduos do ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, componentes do peptidoglicano presentes na parede celular de bactérias Gram-positivo. Além disso, possui atividade contra bactérias mesofílicas e termofílicas formadoras de esporos, como por exemplo *Bacillus*. A lisozima representa 3,5% da proteína total presente no albúmen (Anton *et al.*, 2006; Wellman-Labadie *et al.*, 2007). De acordo com Baker (1974), esse seria o principal motivo para o ovo não se deteriorar como os outros alimentos. Grandes concentrações de lisozima também podem ser encontradas na membrana interna da casca do ovo.

A ovotransferrina ou conalbumina é uma glicoproteína pertencente ao grupo das transferrinas que corresponde a 10% da proteína total do albúmen e possui ação bacteriostática. O mecanismo de ação da conalbumina baseia-se na capacidade de ligação reversível ao ferro tornando-o indisponível para o crescimento bacteriano. Cada molécula de ovotransferrina se liga a dois íons ferro. Bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Escherichia coli* demonstraram ser mais sensíveis a ação da conalbumina do que *Staphylococcus aureus*, *Proteus* e *Klebsiella*. A conalbumina também demonstrou efeito antifúngico não só por indisponibilizar o ferro, mas também por um mecanismo complexo de interação entre as proteínas e as células fúngicas ainda não estabelecido (Mine e Kovacs-Nolan, 2004, Wellman-Labadie *et al.*, 2007).

A avidina é uma glicoproteína presente no albúmen (0,05%) com uma estrutura tetramérica que se liga a biotina impossibilitando seu uso pelas bactérias. Cada molécula de avidina se liga a quatro moléculas de biotina. Trata-se de uma ligação forte e altamente específica. A atividade antimicrobiana da avidina mostrou-se eficiente contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

Alguns tipos de imunoglobulinas como IgA e IgM podem ser encontradas no albúmen, enquanto o IgY está presente na gema. O albúmen também possui alguns inibidores de proteases (ovomacroglobulina e cistatina) que têm papel importante na defesa antimicrobiana (Mine e Kovacs-Nolan, 2004).

A fosvitina é uma proteína presente na gema que por possuir grande quantidade de resíduos de serina fosforilados se liga ao ferro tornando-o indisponível para as bactérias. Noventa e cinco por cento do ferro presente no ovo está na gema e está ligado

a fosfovitina, no entanto, este mineral é de baixa biodisponibilidade (Mine e Kovacs-Nolan, 2004; Wellman-Labadie *et al.*, 2007).

2. Microbiologia da casca do ovo

No momento da postura, aproximadamente 90% dos ovos são livres de micro-organismos. A contaminação do ovo pode ocorrer por três possíveis rotas: a transovariana (a gema é infectada enquanto ainda se encontra no ovário), a transovidutal (a membrana vitelina e o albúmen são contaminados enquanto passam pelo oviduto) e a trans-casca (ocorre quando as bactérias presentes na superfície externa da casca do ovo passam através dos poros e membranas da casca contaminando o conteúdo interno) (Board e Tranter, 1995).

Os ovos são mais vulneráveis à contaminação trans-casca imediatamente após a postura na presença de líquidos e diferença de temperatura. A alta temperatura do corpo da galinha ($\pm 42^{\circ}\text{C}$) associada a menor temperatura do ambiente provoca uma contração dos componentes internos do ovo e os micro-organismos são então “sugados” para dentro devido a uma diferença de pressão. Assim, após a postura qualquer superfície que entre em contato com o ovo pode ser uma fonte de contaminação (Berrang *et al.*, 1999). Após atravessar a casca do ovo fértil e suas membranas não há como impedir a passagem de micro-organismos contaminantes para o albúmen, a gema e o embrião em desenvolvimento (Cox *et al.*, 2000).

A maioria das bactérias penetra a casca do ovo através dos poros, principalmente na região basal (onde está situada a câmara de ar) ou região equatorial, onde é encontrada a maior quantidade dos poros. (Baker, 1974; Board e Tranter, 1995).

Gentry e Quarles (1972) desenvolveram um método para determinar a quantidade de bactérias presentes na superfície da casca do ovo utilizando lavagem dos ovos em sacos de polietileno estéreis com solução salina tamponada fosfatada (PBS). As amostras foram plaqueadas em ágar triptose e incubadas a 37°C por 48 horas. Os autores dividiram os ovos em três grupos: limpos, com linhas fracas de sujeira proveniente do ninho e com manchas de sujeira proveniente de material fecal. As contagens bacterianas foram: $3,2 \times 10^3$, $2,7 \times 10^4$ e $4,1 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia - UFC/ovo para o primeiro, segundo e terceiro grupo de ovos respectivamente. De acordo com Board e Tranter (1995), a quantidade de bactérias presente na casca do ovo pode ser muito variável, de centenas a milhões.

Com o objetivo de identificar a microbiota presente na superfície da casca do ovo, Haines (1938) selecionou aleatoriamente 100 colônias de bactérias provenientes das placas utilizadas para contagem (ágar nutriente e ágar malte) e realizou testes morfológicos e bioquímicos para determinar os gêneros desses micro-organismos. Esse estudo fornece uma ideia da microbiota presente na casca do ovo que está apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Composição aproximada da microbiota obtida pela lavagem da casca do ovo

Gênero	Percentual encontrado (%)	Gênero	Percentual encontrado (%)
<i>Achromobacter</i>	19	<i>Bacillus</i>	24
<i>Pseudomonas</i>	6	<i>Micrococcus</i>	18
<i>Alcaligenes</i>	4	<i>Staphylococcus</i>	5
<i>Flavobacterium</i>	3	Coliformes	4
<i>Proteus</i>	1	Leveduras	4
<i>Aerogenes</i>	1	<i>Actinomyces</i>	3
<i>Sarcina</i>	2	Não identificados	6

Fonte: Adaptado de Haines, 1938.

Board e Tranter (1995), em um estudo semelhante, isolaram 16 gêneros de bactérias provenientes da casca do ovo (Tabela 3). O resultado foi similar ao encontrado por Haines (1938), demonstrando que ao longo do tempo não houve mudanças no perfil bacteriológico da casca.

Tabela 3. Tipos de micro-organismos presentes na casca de ovos de galinhas

Gênero	Frequência de ocorrência ^a
<i>Streptococcus</i>	±
<i>Staphylococcus</i>	+
<i>Micrococcus</i>	++
<i>Sarcina</i>	±
<i>Arthrobacter</i>	+
<i>Bacillus</i>	+
<i>Pseudomonas</i>	+
<i>Acinetobacter</i>	+
<i>Alcaligenes</i>	+
<i>Flavobacterium</i>	+
<i>Cytophaga</i>	+
<i>Escherichia</i>	+
<i>Aerobacter</i>	+
<i>Aeromonas</i>	±
<i>Proteus</i>	±
<i>Serratia</i>	±

^a Presença: ±ocasionalmente, +na maioria dos ovos, mas em pouca quantidade, e ++ sempre presente e em grande quantidade. Adaptado de Board e Tranter (1995).

De acordo com Board e Tranter (1995), as principais fontes de contaminação da casca do ovo são a poeira, a cama e as excretas.

Mine *et al.* (2003) afirmaram que comparativamente com a quantidade de bactérias Gram-positivo encontradas na casca do ovo, as bactérias Gram-negativo representam uma pequena fração, fato este que contradiz Haines (1938) e Board e Tranter (1995), já que a proporção de bactérias Gram-positivo e Gram-negativo encontradas na superfície da casca do ovo foi similar. Mine *et al.* (2003) justificaram que a menor quantidade de bactérias Gram-negativo presentes na casca do ovo se deve a motilidade e tendência desse grupo de bactérias não se agrupar, o que permite a estes micro-organismos alcançarem o interior do ovo com mais facilidade causando deterioração. Contudo, as bactérias Gram-positivo sobrevivem mais na superfície da casca do ovo por serem resistentes a dessecação e devido a espessura e composição de suas paredes celulares.

A deterioração dos ovos está normalmente relacionada à contaminação por bactérias Gram-negativo pertencentes a mais de um gênero. É raro o envolvimento de bactérias Gram-positivo nesse processo. Os contaminantes do albúmen e da gema mais comuns são *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Escherichia* e *Serratia*. De forma

geral, são bactérias pouco exigentes nutricionalmente que apresentam alguma habilidade de crescer em baixas temperaturas. Fungos parecem ser menos importantes que bactérias na deterioração dos ovos e estão relacionados com condições de armazenamento em que há alta umidade. As hifas podem penetrar os poros da casca colonizando a membrana da casca e causando a gelatinização do albúmen (Board e Tranter, 1995). As alterações encontradas na deterioração dos ovos e sua classificação de acordo com Board e Tranter (1995), estão apresentadas na tabela 4. A figura 1 ilustra como os ovos contaminados podem se apresentar:

Tabela 4. Alterações ocorridas em ovos infectados com culturas bacterianas puras

Micro-organismo	Atributo metabólico						Alteração	Tipo de deterioração
	1	2	3	4	5	6		
<i>Proteus</i> sp.	+	+	-	-	-	-	Gema marrom escura de aspecto granular; albúmen marrom escuro	Negra tipo 2
<i>Aeromonas liquefaciens</i>	+	+	+	-	-	-	Gema enegrecida e escura; albúmen cinza liquefeito	Negra tipo 1
<i>Enterobacter</i> sp..	(+)	(+)	+	-	-	-	Gema incrustada com material cremoso e ocasionalmente salpicada com pigmento verde-oliva	Creme
<i>Serratia marcescens</i>	(+)	-	+	+	-	-	Albúmen manchado de vermelho; gema envolta em material cor creme	Vermelha
<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
<i>Flavobacterium Cytophaga</i>	-	-	-	+	-	-	Pigmentação amarela formada na membrana no local de crescimento microbiano	Amarelo
Outros <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> sp.	-	-	-	-	-	+	Apesar de largas populações se desenvolverem não existem alterações microscópicas na gema e albúmen	Sem cor

^a 1, proteólise; 2, produção de H₂S; 3, lecitinase; 4, pigmento solúvel; 5, pigmento insolúvel; e 6, negativo em todos esses testes. Parêntesis indicam que apesar do organismo possuir esse atributo, não existe evidência que isso contribua para a deterioração de um ovo. Adaptado de Board e Tranter (1995).

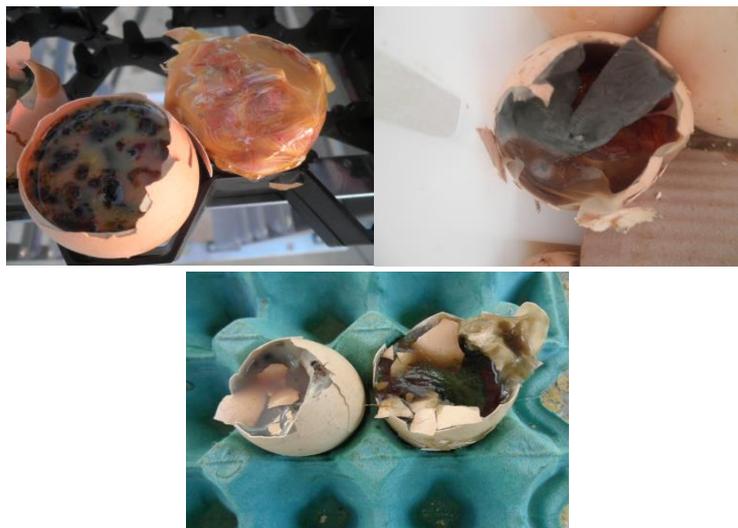


Figura 1. Amostras de ovos contaminados encontrados no momento do embriodiagnóstico
Fonte: Arquivo pessoal.

Além dos agentes citados, vários sorovares de *Salmonella* podem ser encontrados na superfície da casca do ovo por serem micro-organismos comensais do trato gastrointestinal das galinhas (Baker, 1974). De acordo com Cox *et al.* (2000), bactérias do gênero *Salmonella* podem contaminar os ovos férteis por duas vias: vertical (quando a galinha está infectada) e horizontal (quando a bactéria penetra a casca do ovo após a postura). A contaminação das galinhas com *Salmonella* Enteritidis (10^6) não afetou a produção de ovos, e todas as amostras de excretas testadas foram negativas, no entanto, em 10% das gemas de ovos amostradas foram encontradas bactérias do gênero *Salmonella*. Quando se examina a contaminação dos ovos por *Salmonella* Enteritidis em galinhas naturalmente infectadas a incidência é baixa (0,065% - duas amostras em 16.000 ovos) (Poppe *et al.*, 1992).

De acordo com Wells *et al.* (2011), a presença de bactérias patogênicas possui impacto maior na contaminação interna do ovo e, conseqüentemente, na eclodibilidade. Métodos moleculares têm sido utilizados para a identificação de bactérias presentes na superfície da casca do ovo. De Reu *et al.* (2006a) realizaram o sequenciamento do gene 16S rRNA de colônias de bactérias provenientes da lavagem (10ml de diluente/ovo) dos ovos considerados limpos e sujos de poedeiras comerciais criadas em aviário convencional. O meio de cultura utilizado para o cultivo das bactérias foi o ágar nutriente. O sequenciamento revelou que as principais espécies de bactérias encontradas

na casca de ovos limpos e sujos foram *Staphylococcus linens* e *Staphylococcus equorum*.

Olsen *et al.* (2017) determinaram o microbioma da casca do ovo de matrizes pesadas (linhagem Ross 308) antes e após a desinfecção, utilizando extração do DNA, amplificação e sequenciamento do gene que expressa a proteína 16S rRNA. As amostras foram coletadas por meio de “swabs” de ovos limpos e sujos em quatro diferentes tempos: antes da desinfecção, após a desinfecção na fazenda com formaldeído (40mL) a 40% e permanganato de potássio 20g/m³ por 20 minutos, após a desinfecção no incubatório com o mesmo desinfetante na mesma concentração e tempo realizados na fazenda e após a desinfecção com uma solução de amônia quaternária e glutaraldeído (0,5%) no momento da transferência, que foi no 18º dia de incubação. Foram também realizados cultivos em ágar sangue por 24 horas a 37°C para determinação da contagem microbiana total. De acordo com os autores, a contagem microbiana é importante para avaliar a eficácia da desinfecção, pois o método utilizado para a caracterização do microbioma da casca do ovo detecta o DNA de bactérias viáveis e não viáveis.

A contagem microbiana dos ovos sujos antes da desinfecção foi 1,6 x10⁶ UFC/ovo e nos ovos limpos 7,8x10⁴ UFC/ovo. Inicialmente, a carga microbiana dos ovos sujos foi maior do que aquela dos ovos limpos; porém após a aplicação dos processos de desinfecção não houve diferença entre as cargas microbianas. A maioria das bactérias encontrada nos ovos sujos e limpos antes da desinfecção pertenciam aos filos *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. No entanto, os ovos sujos apresentaram uma microbiota menos diversa com presença de mais bactérias patogênicas quando comparada com a microbiota dos ovos limpos. Em ambos os tipos de ovos foram observadas reduções de bactérias da família Clostridiales e aumento de bactérias da família Lactobacilliales após os procedimentos de desinfecção, mas a maioria das bactérias ainda pertencia ao filo *Firmicutes*. De acordo com os autores, houve grande variação no microbioma da casca de ovos pertencentes ao mesmo grupo de amostras (ovos limpos e ovos sujos no mesmo momento da amostragem), o que pode sugerir que os ovos se contaminam inicialmente na cloaca e isso varia de galinha para galinha (Olsen *et al.*, 2017).

3. Desinfecção de ovos férteis

A desinfecção eficiente dos ovos férteis e adequadas condições higiênicas no incubatório auxiliam no fornecimento de produtos avícolas de maior qualidade (Musgrove *et al.*, 2014). Várias bactérias, incluindo as espécies de *Salmonella* patogênicas para o homem, possuem a capacidade de penetrar a casca de um ovo fértil e suas membranas. Como consequência, pode haver redução da eclodibilidade e contaminação dos pintinhos, não só daquele pintinho proveniente do ovo contaminado, mas dos outros que estão dividindo o mesmo nascedouro (Berrang *et al.*, 1999). Por isso, a utilização de ovos férteis de alta qualidade é fundamental para que o incubatório obtenha altos níveis de eclosão e pintos de qualidade (Cony *et al.*, 2008). De acordo com Tona *et al.* (2005), ovos férteis de qualidade são ovos limpos, sem deformações ou trincas e provenientes de aves saudáveis.

Após a postura ocorre um processo de resfriamento dos ovos gerando uma diferença de pressão entre o meio externo e interno do ovo e essa diferença de pressão provoca um fluxo natural de ar da superfície da casca do ovo para o interior. Este fenômeno pode carrear bactérias e fungos através dos poros da casca e é por isso que o melhor momento de realizar a desinfecção dos ovos é logo após a postura (Cony *et al.*, 2008), de preferência, nas primeiras duas horas após a postura.

A principal fonte de contaminação dentro do incubatório são os ovos sujos provenientes de granjas com precária condição sanitária. A temperatura (37,5-37,8°C) e a umidade (55-60%) usadas para a incubação dos ovos são fatores que favorecem a proliferação desses micro-organismos, o que reforça a importância da desinfecção dos ovos nas granjas (Samberg e Meroz, 1995).

Rehkopf *et al.* (2017) inocularam ovos com *Salmonella* Typhimurium e armazenaram esses ovos a 18°C por até sete dias. Em metade dos ovos não foi realizado processo de desinfecção e a outra metade os ovos foi desinfetada com peróxido de hidrogênio (3,2%) e UV-C (10 mW/cm² por aproximadamente 40 segundos) e a contagem microbiológica foi avaliada. As amostras foram coletadas por meio da lavagem da superfície da casca do ovo nos dias zero, um, dois, três, cinco e sete de armazenamento. A contagem de *Salmonella* foi maior até o terceiro dia de armazenamento no grupo de ovos que não foi desinfetado. A partir do quinto dia não foi encontrada diferença entre os tratamentos. De acordo com os autores, estes resultados demonstram a importância de realizar a desinfecção dos ovos logo após a postura. Além

disso, os autores destacam a importância de avaliar a contaminação do ovo por *Salmonella* não só na superfície da casca do ovo, mas também nas membranas, no albúmen e na gema, pois a contagem microbiológica do grupo não tratado diminuiu ao longo do tempo, o que pode ter ocorrido devido a passagem da bactéria para o interior do ovo.

Após a postura, qualquer superfície que entre em contato com a casca do ovo como o ninho, os pentes, as mãos dos funcionários, pode servir de veículo de transmissão de micro-organismos, o que determina a heterogeneidade da microbiota (Staldeman e Cotterill, 1995).

Algumas estratégias podem ser utilizadas pela granja para reduzir a contaminação microbiana na superfície da casca do ovo, como: o número de coletas dos ovos, o material utilizado no ninho e sua substituição quando necessário, a qualidade da cama, o manejo das aves quando iniciam a postura e a desinfecção dos ovos logo após a coleta. Além disso, após a desinfecção é importante controlar a temperatura e a umidade durante o transporte dos ovos ao incubatório e na sala de armazenamento de ovos para evitar a condensação da superfície da casca do ovo e, com isso, a recontaminação. Mesmo com um bom protocolo de desinfecção e um adequado manejo dos ovos na granja ainda haverá ovos contaminados.

De acordo com Berrang *et al.* (1997), após a desinfecção, os ovos devem ser tratados cuidadosamente a fim de evitar a contaminação cruzada, que pode ocorrer durante o transporte até o incubatório ou dentro da incubadora. Os autores observaram que a contagem microbiana da casca do ovo não alterou ao longo da idade da galinha (29 a 59 semanas) e esse resultado foi justificado pelo método de coleta utilizado na fazenda (automática) e à boa qualidade da casca dos ovos.

Berrang *et al.* (1997) compararam as contagens de bactérias aeróbicas totais e Enterobacteriaceae entre ovos limpos e ovos sujos (sujos de cama e/ou fezes) após processo de lavagem e desinfecção em máquina comercial (cloro e amônia quaternária) e não encontraram diferenças significativas. Contudo, os ovos sujos passaram pela máquina três vezes (na primeira vez foram lavados somente com cloro) e os autores não avaliaram a cutícula da casca desses ovos e nem o rendimento de incubação, pois a lavagem dos ovos retiraria essa camada da casca.

O objetivo da desinfecção de ovos férteis é basicamente reduzir a contagem microbiana da superfície da casca e, assim, diminuir os efeitos adversos da

contaminação, provocando danos mínimos ao desenvolvimento do embrião (Cardici, 2009). A escolha de um desinfetante para ser usado em um programa de desinfecção deve levar em consideração não somente a capacidade do produto em eliminar micro-organismos, mas também o custo, a praticidade e a segurança do trabalhador (Berrang *et al.*, 2000; Cony *et al.*, 2008).

Os desinfetantes podem atuar em três regiões da célula bacteriana: a parede celular, a membrana citoplasmática e o citoplasma. A absorção e progressão do desinfetante nos alvos da célula bacteriana são influenciadas por fatores como: concentração, formulação, pH e temperatura. Portanto, fatores externos podem influenciar o grau da injúria celular bacteriana sem necessariamente haver alteração do mecanismo de ação (Denyer e Stewart, 1998).

De acordo com Cony *et al.* (2008), os métodos de desinfecção de ovos comumente utilizados na indústria são: a fumigação (formaldeído associado ao permanganato de potássio ou paraformaldeído), a pulverização e a imersão. Em ovos destinados para o consumo, compostos a base de cloro e de amônia quaternária são mais utilizados para desinfecção (Al-Ajeeli *et al.*, 2016). No entanto, em grande parte da avicultura industrial no Brasil, para a desinfecção de ovos férteis logo após a postura são utilizados compostos pertencentes à classe dos aldeídos, sendo o mais utilizado o formaldeído. O formaldeído é um agente irritante para olhos, nariz e garganta com propriedades carcinogênicas (Samberg e Meroz, 1995). Efeitos adversos à saúde do trabalhador associado ao uso de formaldeído (tanto como agente fumigante ou pulverizante) têm levado a busca por novos desinfetantes (Berrang *et al.*, 2000). Portanto, os seguintes tópicos dessa revisão de literatura abordam as características e os efeitos do principal desinfetante utilizado em ovos férteis assim como as características e os efeitos de alguns produtos com potencial para substituí-lo.

3.1. Formaldeído (CH₂O)

O formaldeído é um excelente agente antimicrobiano. Porém, é tóxico e, por isso, pode prejudicar seriamente o desenvolvimento do embrião se aplicado de forma incorreta. De acordo com Gholami-Ahangaran *et al.* (2016), o formaldeído até o momento é o principal e mais efetivo desinfetante para redução da contaminação da casca de ovos férteis. A atividade bactericida e fungicida do formaldeído se deve a sua habilidade de se ligar aos grupamentos amida e amino das proteínas dos micro-

organismos e aos átomos de nitrogênio das bases purinas e pirimidinas do DNA e do RNA (Cardici, 2009). Além disso, é um desinfetante barato, acessível que quando utilizado de forma inapropriada pode causar morte embrionária. No entanto, a utilização de formaldeído tem sido associada aos seus efeitos citotóxicos que causam reações inflamatórias, necrose e mutações nas células do sistema respiratório das pessoas responsáveis pela manipulação do produto (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2016).

A ação do formaldeído é influenciada por fatores como concentração, tempo de exposição, temperatura, umidade e quantidade de matéria orgânica na casca do ovo. A concentração efetiva de formaldeído depende da temperatura da câmara de fumigação. Temperaturas maiores (37,5°C) necessitam de uma concentração menor de formaldeído por m³. A temperatura que usualmente é utilizada para fumigação é 25°C. Se o formaldeído é utilizado na forma de gás, a umidade relativa do ar influencia sua ação, pois as partículas de gás são carregadas pelas gotas de água. A umidade relativa do ar deve ser mantida em 75% ou mais para uma desinfecção eficiente (Cardici, 2009; Branco, 2017).

Na indústria avícola brasileira, as principais formas de utilização do formaldeído para desinfecção de ovos férteis são o formaldeído líquido a 37% e sua forma polimerizada, o paraformaldeído (Branco, 2017). Ele é um gás ou um líquido incolor, de odor intenso e característico. De acordo com Samberg e Meroz (1995), a concentração de formaldeído para desinfecção de ovos férteis recomendada é de 10,5-13g/m³.

Whistler e Sheldon (1989) avaliaram o efeito da desinfecção de ovos férteis com ozônio e formaldeído sobre a contagem de bactérias aeróbicas totais, a condutância da casca e a eclodibilidade sobre o número de ovos férteis. O diferencial desse trabalho deve-se ao fato de os pesquisadores terem avaliado um parâmetro de qualidade da casca do ovo e de rendimento de incubação concomitante com a avaliação microbiológica. A concentração de ozônio média utilizada foi de 3,0% (peso/peso) e a fumigação com formaldeído foi realizada na seguinte proporção: 119,8 ml de formaldeído misturado com 59,9g de permanganato de potássio (três vezes) em uma câmara com 2,83m³. A desinfecção com ozônio e formaldeído reduziram ($p \leq 0,05$) a contagem de bactérias aeróbicas totais em 2,5 logs e 3 logs, respectivamente. A condutância da casca não foi alterada ($p > 0,05$) pelos tratamentos. No entanto, os ovos desinfetados com ozônio

apresentaram menor eclodibilidade ($p \leq 0,05$) quando comparado com os ovos dos tratamentos controle e formaldeído.

Cony *et al.* (2008) realizam a desinfecção dos ovos férteis por imersão, cujos princípios ativos utilizados foram os seguintes: amônia, amônia e glutaraldeído, clorexidina, amônia e ureia, fenol e formaldeído (sublimação). Logo após a desinfecção foi feita a avaliação microbiológica da casca do ovo. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os desinfetantes para a contagem de mesófilos totais, leveduras, *Pseudomonas* sp. e *Aspergillus* sp. A porcentagem de ovos contaminados e a eclodibilidade não diferiu ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No embriodiagnóstico, a mortalidade embrionária entre quatro a sete dias foi maior ($p < 0,05$) no tratamento com formaldeído e menor no tratamento com amônia, sendo que os demais desinfetantes foram estatisticamente semelhantes aos tratamentos com amônia e com formaldeído.

3.2. UV-C

A radiação ultravioleta é composta por comprimentos de onda eletromagnéticas que variam de 100 a 400nm, sendo são elas: UV entre 100 a 200nm, UV-C entre 201 a 280 nm; UV-B entre 281 a 315 nm e UV-A entre 316 a 400nm. A atuação germicida ocorre em maior intensidade entre os comprimentos de onda 245 a 285nm. Essa ação germicida se deve a ruptura das moléculas de DNA dos micro-organismos (Branco, 2017).

A exposição dos ovos à luz UV-C por 30 e 60 segundos foi capaz de reduzir significativamente a contagem de bactérias aeróbias totais quando comparada com as contagens dos ovos não submetidos à exposição. Durante a exposição, os ovos foram rotacionados (nove vezes por minuto) e a intensidade da lâmpada UV-C era de $7,35\text{mW}/\text{cm}^2$. A exposição por 60 segundos reduziu de 2 a 3 log UFC/ovo enquanto a exposição por 30 segundos reduziu de 0,8 a 2 log UFC/ovo (Chavez *et al.*, 2002).

Chavez *et al.* (2002) realizaram um segundo experimento no qual foram testados diferentes tempos de exposição dos à luz UV-C (0, 12, 36 e 48 segundos) e diferentes intensidades ($6,55\text{mW}/\text{cm}^2$ e $7,35\text{mW}/\text{cm}^2$). Os resultados mostraram que a exposição dos ovos a uma luz UV-C de alta intensidade e com tempos de 36 ou 48 segundos é suficiente para reduzir a contagem de bactérias aeróbias totais.

De acordo com De Reu *et al.* (2006b), a desinfecção dos ovos com radiação UV-C ($10\text{mW}/\text{cm}^2$) por aproximadamente cinco segundos reduziu a contagem de bactérias

aeróbicas totais na casca dos ovos limpos, o que não ocorreu com os ovos sujos. Os autores acreditam que a matéria orgânica presente na casca dos ovos sujos atuou como uma barreira contra a penetração dos raios UV-C, o que prejudicou seu efeito germicida. Os pesquisadores, no mesmo estudo, encontraram redução significativa na contagem de bactérias aeróbicas totais provenientes da casca de ovos inoculados com *Escherichia coli* ($5,5 \times 10^4$ UFC/ovo) e *Staphylococcus aureus* ($4,3 \times 10^4$ UFC/ovo), quando estes foram submetidos ao processo de desinfecção com UV-C por cinco e 19 segundos. Algumas amostras foram inoculadas internamente (albúmen) com os mesmos micro-organismos descritos e desinfetados. A radiação UV-C não foi capaz de penetrar a casca do ovo e reduzir a contagem microbiológica no albúmen.

A associação de peróxido de hidrogênio com a radiação de luz UV-C para a desinfecção de ovos tem sido avaliada recentemente (Gottselig *et al.*, 2016; Rehkopf *et al.* 2017). Como ambos agentes possuem mecanismo de ação semelhante baseado na geração de espécies altamente reativas ao oxigênio, quando usados em combinação atuam de modo sinérgico. A luz UV-C provoca fotólise das moléculas de peróxido de hidrogênio, o que resulta na liberação de radicais hidroxila. Os pesquisadores têm denominado esse método como processo oxidativo avançado (Rehkopf *et al.*, 2017).

Gottselig *et al.* (2016) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito do uso de diferentes intensidades da luz UV-C (1,3; 8 e 14 mW/cm²), diferentes tempos de desinfecção (15, 30, 45 e 60 segundos), diferentes materiais da bandeja na qual os ovos foram colocados para desinfecção com UV-C (plástico ou de metal) e a necessidade de rotação ou não dos ovos durante a exposição a luz UV-C sobre a contagem de micro-organismos aeróbicos totais. A desinfecção com UV-C era realizada em associação a outro método de desinfecção: pulverização de uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% (0,75ml por ovo) que poderia ser realizada em um, dois ou quatro ciclos. Com tantas variáveis, os autores realizaram uma série de experimentos para conseguir responder a todos os questionamentos. De acordo com os autores, existe interação entre o material da bandeja e a intensidade da luz UV-C. Se for utilizada uma luz de baixa intensidade (1,3 mW/cm²) o melhor material é a bandeja de metal. Contudo, em outras intensidades de luz UV-C o material da bandeja não interferiu na contagem de micro-organismos aeróbicos totais. O número de ciclos que apresentou menor contagem de micro-organismos foi dois e quatro ciclos sem diferença entre eles. Os diferentes tempos de exposição à UV-C e a rotação ou não dos ovos dentro da câmara

UV não interferiu na contagem de micro-organismos aeróbios totais, no entanto, foram diferentes do grupo controle (sem desinfecção).

De acordo com Rehkopf *et al.* (2017), a desinfecção de ovos férteis com H₂O₂ (3,2%) em associação com a luz UV-C (10mW/cm² por 40 segundos) reduziu a contagem de *Salmonella* na superfície da casca do ovo em até 7 log₁₀ UFC/ovo. Antes da realização da desinfecção, os ovos foram inoculados com *Salmonella* Typhimurium. A contagem foi realizada no dia da incubação (0), no quarto e no décimo primeiro dia após a incubação. A contagem de *Salmonella* na casca dos ovos que não foram desinfetados diminuiu ao longo do tempo e não foi encontrada diferença entre os ovos tratados e não tratados no 11º dia de incubação. No dia do nascimento e após 14 dias, apenas 5 % e 10%, respectivamente das aves provenientes dos ovos não desinfetados apresentaram *Salmonella* no trato gastrointestinal.

A radiação UV destaca-se por ser um dos poucos meios de desinfecção que não gera resíduo ao meio ambiente e parece ser eficaz em reduzir a contagem microbiana de produtos quando aplicada corretamente.

3.3. Ozônio (O₃)

O ozônio é formado naturalmente na estratosfera em pequenas quantidades pela ação da radiação UV solar sobre o oxigênio (Kim *et al.*,1999). De acordo com Braun *et al.* (2011), o ozônio (O₃) é reconhecido como um agente antimicrobiano (atuando contra bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, bactérias formadoras de esporos além de fungos e vírus) e seu potencial de aplicação tem sido avaliado pela indústria alimentícia, para desinfecção de ovos férteis, de incubadoras e de carcaças de frangos. Em 2001, o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o ozônio como agente antimicrobiano para ser utilizado em alimentos. No entanto, sua aplicação prática tem se restringido à desinfecção de água de piscina, água potável e águas residuais.

O ozônio é uma substância que possui baixa toxicidade e é de fácil manipulação. Ele é rapidamente decomposto em oxigênio e em outras substâncias biodegradáveis e por isso não gera resíduo para o meio ambiente. Na forma gasosa, ele possui uma meia vida de aproximadamente 20 minutos. A atividade antimicrobiana do ozônio é proporcional à umidade relativa do ar: quanto maior a umidade relativa do ar maior a atividade antimicrobiana do ozônio. A necessidade de uma alta umidade relativa do ar

para um bom processo de desinfecção pode estar associado à formação de radicais hidroxilas e peróxidos (Moat *et al.*, 2009; Braun *et al.*, 2011).

O ozônio é um agente oxidante com potencial de oxidação maior do que do cloro. O modo de ação do ozônio como desinfetante depende do meio em que o micro-organismo está presente e baseia-se na liberação de radicais livres que atuam sobre as ligações duplas das lipoproteínas e a camada de lipopolissacarídeos das bactérias Gram-negativo. Como consequência, há uma alteração da permeabilidade celular o que eventualmente pode provocar o rompimento da célula. A viabilidade de *Escherichia coli* não foi afetada quando exposta ao ozônio (600ppm) por 1 a 5 minutos, mas houve alteração da permeabilidade celular. Quando a exposição foi prolongada (até 30 minutos) a viabilidade celular diminuiu com degradação progressiva das proteínas intercelulares (Kim *et al.*, 1999).

A desinfecção da superfície de uma incubadora com ozônio (1,41 a 1,68%) e 90% de umidade relativa do ar por 37 minutos foi avaliada com relação a contagem microbiológica. Bactérias de quatro diferentes espécies (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Pseudomonas fluorescens* e *Proteus* sp.) foram plaqueadas em meio de cultura PCA (*plate count agar*). Estas mesmas placas foram distribuídas abertas em todas regiões da incubadora (porta, chão, paredes laterais e teto). Após o processo de desinfecção, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C para posterior contagem das colônias. A desinfecção com ozônio reduziu a contagem de todas as espécies de bactérias avaliadas comparadas com o tratamento controle – sem desinfecção (Whistler e Sheldon, 1989).

No trabalho de Braun *et al.* (2011), o ozônio na forma de gás foi capaz de reduzir a contagem de *Salmonella Enteritidis* (SE) na casca do ovo. Os autores avaliaram o efeito da desinfecção de ovos férteis com ozônio em diferentes tempos de exposição (60, 90, 120 e 180 minutos), diferentes concentrações (0,5%, 1%, 3% e 5% - peso/peso) e duas diferentes umidades relativas do ar (30 e 70%). A umidade relativa do ar de 70% promoveu redução de SE na casca. A concentração de 1% de ozônio por 120 minutos com 70% de umidade relativa do ar eliminou a contaminação na casca do ovo por SE ($10^2 - 10^4$ UFC/ovo). O maior tempo de exposição (180 minutos) não resultou em maior taxa de redução. Entretanto, um alto tempo de exposição (180 minutos) associado a uma alta concentração (3%) resultou na eliminação de SE na casca do ovo, mas foram encontrados danos no DNA do embrião.

3.4. Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

De acordo com Mattos *et al.* (2003), o H₂O₂ é um dos oxidantes mais versáteis que existe. Ele é um líquido incolor, de odor característico e termodinamicamente instável (a taxa de decomposição aumenta 2,5 vezes para cada 10°C de incremento na temperatura) decompondo-se em água e oxigênio. O potencial redox, ou seja, a espontaneidade ou tendência de uma espécie química adquirir elétrons e desse modo ser reduzida, do H₂O₂ é 1,76V (potencial redox do ácido peracético é 1,81V e do ozônio é 2,01V), o que o caracteriza como um oxidante relativamente poderoso (Finnegan *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação dos agentes biocidas depende de sua natureza química. De uma forma geral, os agentes oxidantes possuem baixo peso molecular e são capazes de penetrar a membrana e a parede celular dos micro-organismos permitindo-o interagir com os componentes intracelulares (Mattos *et al.*, 2003). A reação do íon superóxido com o H₂O₂ forma o radical hidroxila, que é altamente reativo. Sendo assim, o radical hidroxila pode atacar a membrana lipídica, o DNA e outros componentes celulares dos micro-organismos alterando a síntese proteica, permeabilidade e multiplicação celular, o que causa morte celular (Sander e Wilson, 1999).

Bailey *et al.* (2001) avaliaram a eficácia de uma solução de H₂O₂ (1,4%) quando exposta a dois diferentes contaminantes orgânicos (suspensão de fezes ou suspensão de gema e de albúmen) na eliminação de *Salmonella* Typhimurium (inoculada na amostra composta da solução de H₂O₂ e contaminante). De acordo com os autores, a importância de avaliar a ação do desinfetante frente a estes contaminantes seria simular o que aconteceria a campo e, assim, determinar se o desinfetante teria ação na presença de matéria orgânica. A presença das fezes reduziu a capacidade da solução de H₂O₂ eliminar *Salmonella* Typhimurium. No entanto, o mesmo não foi observado quando os materiais contaminantes eram a gema e o albúmen. O armazenamento da solução em temperatura ambiente por 24 ou 48 horas não reduziu sua eficácia em eliminar *Salmonella* Typhimurium.

A desinfecção de ovos férteis inoculados com *Salmonella* Typhimurium (4,1x10⁴ UFC/ovo) com uma solução de H₂O₂ 1,4% foi eficiente em reduzir a contaminação da superfície da casca do ovo. Dos 80 ovos amostrados e analisados, apenas um apresentou crescimento de micro-organismos em ágar verde brilhante com sulfadiazina incubado a 37°C por 24 horas (Buhr *et al.*, 2013).

Um estudo foi realizado por Keita *et al.* (2016) com o objetivo de pesquisar desinfetantes alternativos ao formaldeído. Foram testados diferentes produtos: H₂O₂, dicloroisocianurato de sódio (DS) e água eletrolisada oxidante (AEO). Além de avaliar o efeito desses desinfetantes sobre a carga microbiana na casca (micro-organismos aeróbicos totais), eclodibilidade e desempenho zootécnico dos frangos, os autores avaliaram o efeito residual dos produtos no ambiente. O intuito de investigar o efeito residual se deve a preocupação com a saúde do trabalhador. Nenhum dos métodos de desinfecção foi aplicado diretamente sobre os ovos, como a pulverização ou a imersão, e sim realizada desinfecção do ambiente (denominada desinfecção aérea pelos autores) que diferiu de acordo com o produto utilizado. Os métodos de desinfecção utilizados foram: para o H₂O₂ a 6%, o formaldeído (23%) e a AEO (300-400 ppm de cloro) a nebulização; para o H₂O₂ 30% a vaporização (aparelho gerador de H₂O₂ na forma de gás) e para o DS (1500 ppm) a termonebulização. O único tratamento que apresentou nível de desinfetante no ambiente acima do permitido pelo Ministério do Trabalho Francês foi o H₂O₂ a 6%. O mesmo não ocorreu com o H₂O₂ a 30%, provavelmente pela diferença no método de aplicação. O formaldeído, o H₂O₂ a 30% e o DS reduziram a contagem de micro-organismos totais da superfície da casca do ovo. A eclosão total, eclosão sobre o número de ovos férteis e a porcentagem de pintos vendáveis foi maior nos ovos desinfetados com H₂O₂ a 30%. O peso corporal dos frangos aos 11, 21 e 28 dias e a conversão alimentar não diferiram entre os tratamentos.

3.5. Ácido peracético (APA)

O ácido peracético ou ácido peroxiacético (APA) é um forte agente oxidante e desinfetante. Seu potencial de oxidação é maior do que o potencial de oxidação do cloro e do dióxido de cloro. O APA está comercialmente disponível na forma de uma mistura equilibrada contendo ácido acético, peróxido de hidrogênio, ácido peracético e água de acordo com a equação: $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CO}_3\text{H} + \text{H}_2\text{O}$, em que CH₃CO₂H representa ácido acético; H₂O₂ peróxido de hidrogênio e CH₃CO₃H: ácido peracético.

De acordo com Kitis (2004), o APA é um agente antimicrobiano mais efetivo que o H₂O₂, pois é altamente eficiente em baixas concentrações e atua contra um amplo espectro de micro-organismos. O APA combina as características do oxigênio ativo proveniente do peróxido dentro de uma molécula de ácido acético pertencendo a classe dos peróxidos.

Ele é um líquido incolor, solúvel em água, com odor forte, sem capacidade de formar espuma e com pH menor que 2.

O APA é considerável menos estável que H₂O₂. Uma solução de APA 40% perde de 1 a 2% de seus ingredientes ativos por mês enquanto uma solução de H₂O₂ (30 a 90%) perde menos de 1% por ano. No geral, as soluções comerciais de APA disponíveis possuem uma concentração de 10-15%. A eficiência de desinfecção com APA pode ser ordenada da seguinte forma: bactericida > viricida > esporocida. O modo de ação do APA como agente antimicrobiano baseia-se na formação de espécies ativas de oxigênio. Basicamente, ele pode provocar uma alteração da função da membrana citoplasmática lipoproteica ou a ruptura da parede celular bacteriana. Por essa atuação nas membranas lipoproteicas o APA pode ter maior ação em contra bactérias Gram-negativo (Kitis, 2004).

O APA tem sido estudado para desinfecção de águas residuais assim como o ozônio e a radiação UV, desinfecção de instrumentos odontológicos e na indústria alimentícia e de bebidas. Para uma desinfecção eficiente com APA a dosagem é o fator mais importante do que o tempo de exposição. A presença de matéria orgânica pouco interfere em seu modo de ação e quando degradado não gera resíduo tóxico para o ambiente (Kittis, 2004; Luukkonen *et al.*, 2014). O APA foi aprovado para ser utilizado na desinfecção de frutas e vegetais sem a necessidade de enxágue e para a lavagem de ovos (FDA, 2018).

Scur *et al.* (2014) realizaram um teste de eficácia de vários desinfetantes (APA, hipoclorito de sódio, amônia quaternária, ácidos orgânicos, iodo e glutaraldeído) sobre uma suspensão de *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*. O tempo de contato da suspensão com o desinfetante foi de 20 minutos e parte das amostras foram desafiadas com a presença de matéria orgânica. As concentrações utilizadas foram: a recomendada pelo fabricante, a metade e o dobro. Na presença de matéria orgânica, o uso APA e ácidos orgânicos resultaram nas menores contagens bacterianas e, por isso, apresentaram maior eficácia no controle de *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*. Na ausência de matéria orgânica, o APA reduziu 100% as contagens para ambas as suspensões de bactérias testadas.

Al-Ajeeli *et al.* (2016) avaliaram o efeito do uso de desinfetantes em ovos de consumo na contagem de bactérias aeróbias totais e de *Salmonella* Enteritidis na superfície da casca do ovo. Os desinfetantes utilizados foram: cloro (100 ppm), amônia

quaternária (200 ppm), ácido peracético (135 ppm) e água oxigenada (3,5%) associada a luz ultravioleta (UV-C/8 a 12 mV/cm²). Os ovos passaram por uma câmara onde os desinfetantes foram aspergidos sobre os ovos por cinco segundos. O equipamento possui duas câmaras para aspersão e em todos os tratamentos os ovos foram aspergidos duas vezes. Foram coletadas amostras no dia da desinfecção, após sete e 14 dias. Os ovos ficaram armazenados a 4°C. A desinfecção dos ovos com água oxigenada + UV-C apresentou a maior redução na contagem de micro-organismos aeróbios totais na superfície casca do ovo comparada aos outros tratamentos em todos os tempos amostrados. A utilização do APA + UV-C não apresentou vantagem comparada a utilização do APA sozinho. Para os ovos que foram inoculados com *Salmonella* Enteritidis todos os métodos de desinfecção reduziram a contagem de *Salmonella* Enteritidis abaixo de nível de detecção imediatamente após o tratamento.

Ovos comerciais inoculados com *Escherichia coli* (4,64 log UFC/ml) foram avaliados quanto ao procedimento de desinfecção com cloro (200mg/kg) e APA (100mg/kg) por imersão durante 2,5 minutos. Após a imersão na solução desinfetante, os ovos foram transferidos para uma solução estéril de água peptonada 0,1% (100ml) e dessa solução foi retirado 1ml para o pré-enriquecimento. Em seguida, a amostra foi plaqueada em ágar eosina azul de metileno e incubada a 37°C por 24 horas. Ambos os desinfetantes eliminaram em 100% *Escherichia coli* inoculada por imersão nos ovos. No entanto, de acordo com os autores, o APA demonstrou ser mais eficiente que o cloro, pois foi utilizada metade da dose para desinfecção quando comparado com o cloro (Vinayananda *et al.*, 2017).

Clímaco *et al.* (2018) submeteram ovos férteis de matrizes pesadas com 42 semanas à diferentes procedimentos de desinfecção e avaliaram seus efeitos na contagem microbiana e qualidade da casca do ovo. Os tratamentos consistiam de cinco procedimentos de desinfecção: fumigação com paraformaldeído (13,33 g/m³), fumigação com ozônio (5-10 ppm), irradiação com luz UV-C (6,36 mW/cm²), pulverização com peróxido de hidrogênio (1,56%) e pulverização com ácido peracético (0,13%), além de dois tratamentos controles: úmido e seco. A desinfecção com paraformaldeído e UV-C reduziu significativamente a contagem de micro-organismos aeróbios totais da superfície da casca do ovo e nenhum dos tratamentos influenciou a espessura e resistência da casca.

4. Aplicação da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) na identificação de micro-organismos

Os métodos tradicionais para identificação de micro-organismos baseiam-se inicialmente na coloração pelo Gram seguido dos testes catalase e oxidase. Logo após, testes bioquímicos e sorológicos (fenotípicos) são aplicados para completar a identificação. Em função desses testes, é necessário o cultivo e isolamento das bactérias em meios seletivos, o que torna o processo longo até a obtenção do resultado final, sendo que, em certas ocasiões não é possível determinar a espécie da bactéria presente na amostra (Carbonelle *et al.*, 2011).

A partir disso, surge a necessidade do desenvolvimento de técnicas capazes de identificar micro-organismos de forma rápida e precisa. A utilização de métodos moleculares para a identificação de micro-organismos nas duas últimas décadas cresceu muito. Esses métodos permitem uma identificação rápida e precisa, sendo alguns exemplos: a *Polymerase chain reaction* (PCR) (Carbonelle *et al.*, 2011) e sequenciamento de genes como 16S e 23S rRNA. No entanto, as técnicas moleculares exigem mão-de-obra qualificada e possuem custo maior.

Microbiologistas têm despertado interesse pela análise proteômica por permitir uma identificação rápida, barata e confiável de bactérias na rotina laboratorial. Com a revolução da espectrometria de massa ao longo dos anos, o sequenciamento dos produtos proteicos (obtidos diretamente das colônias), expressos a partir do genoma das bactérias, ganhou destaque na microbiologia para potencial uso em: estudos epidemiológicos, identificação de micro-organismos que habitam um determinado ecossistema, detecção de patógenos de origem alimentar e hídrica, dentre outros (Fox, 2006; Benagli *et al.*, 2011; Singhal *et al.*, 2015).

4.1 Princípio da técnica

A espectrometria de massas é uma técnica analítica na qual os compostos são ionizados transformando-se em moléculas carregadas em que a proporção massa e carga é medida. A ionização e a dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) foi desenvolvida na década de 1980, o que aumentou a aplicação da espectrometria de massas em grandes moléculas, como as proteínas (Shinghal *et al.*, 2015). No entanto, de

acordo com Carbonelle *et al.* (2011), o primeiro relato de identificação bacteriana baseada na técnica MALDI-TOF foi em 1996.

Para a análise por MALDI, a amostra precisa ser misturada ou revestida por um composto orgânico absorvente de energia, chamado matriz (ácido cinâmico ou um derivado do ácido benzoico). A amostra com a matriz cristalizada é, então, ionizada por um feixe de *laser*. A dessorção e a ionização com o *laser* geram íons individualmente protonados que serão acelerados (pelo campo eletromagnético) a um potencial fixo onde serão separados de acordo com a proporção de sua massa e carga. As moléculas carregadas são detectadas e medidas usando diferentes analisadores de massas; porém, para aplicação microbiológica o mais utilizado é o tempo de voo (*time of flight* - TOF). Durante a análise MALDI-TOF, a proporção massa/carga de um íon é avaliada pelo tempo que ele gasta para percorrer o tubo. Baseado na informação do TOF, um espectro característico chamado *peptide mass fingerprint* (PMF) é gerado. A identificação do micro-organismo é feita por um *software* que compara o PMF da amostra com o PMF contido em um banco de dados e um valor numérico (escore) é gerado com base nas similaridades entre o espectro da amostra e o do banco de dados. Este escore informa a validade da identificação. Se o escore for acima de 2,0 é considerada uma identificação válida ao nível de espécie. Se este valor for entre 1,7 e 2,0 tem-se uma identificação válida ao nível de gênero. A análise MALDI-TOF é uma técnica rápida, confiável e de baixo custo para a identificação de bactérias (Wieser *et al.*, 2011; Shinghal *et al.*, 2015). A figura 2 apresenta o esquema do mecanismo de funcionamento do MALDI-TOF MS.

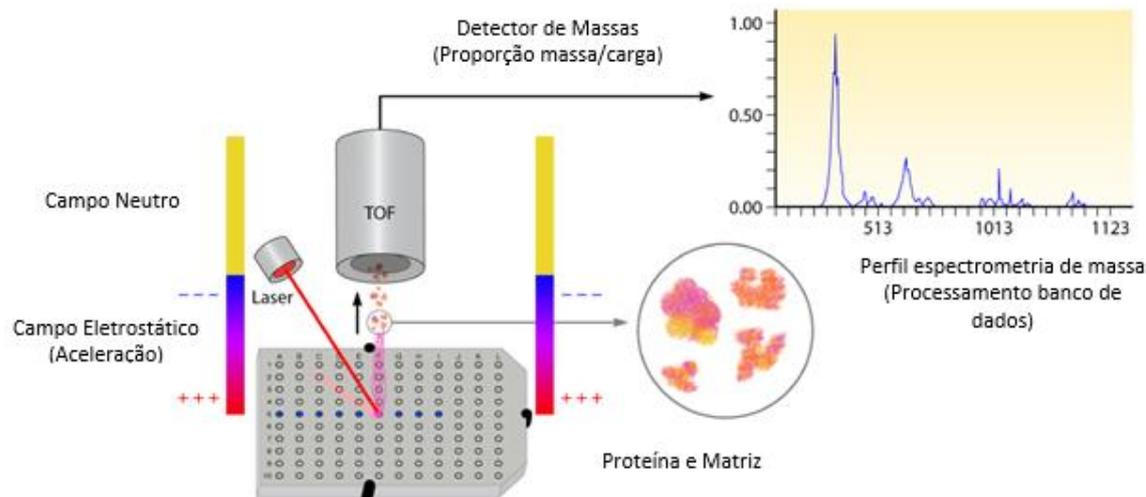


Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de funcionamento do MALDI-TOF MS. Uma vez que as amostras adequadamente processadas são adicionadas a placa, coberta com matriz e seca, a amostra é bombardeada pelo laser. Este bombardeamento resulta na sublimação e ionização da amostra e matriz. Os íons gerados são separados com base em sua relação massa-carga ao longo de um tubo, sendo medido o tempo gasto para percorrê-lo – TOF. Uma representação espectral desses íons é gerada e analisada pelo *software*, gerando um perfil. Este perfil é posteriormente comparado com perfis depositados em um banco de dados, gerando uma identificação para a bactéria contida na amostra.

Fonte: Adaptado de Clark *et al.* (2013)

De acordo com Carbonelle *et al.* (2011), uma mesma espécie pode apresentar espectros de massas distintos dependendo de condições de cultivo ou quando diferentes métodos de extração são aplicados. No entanto, Wieser *et al.* (2011) afirmam que, de acordo com a faixa de tamanho das proteínas que são identificadas (2 a 20kDa), elas são em grande parte proteínas ribossomais que possuem a característica de se ionizarem bem, fornecendo um espectro preciso e pouco são influenciadas pelas condições de cultivo.

4.2 Aplicação da técnica MALDI-TOF MS na avicultura

A técnica MALDI-TOF MS tem sido empregada na avicultura em uma variedade de estudos, como: na identificação e quantificação de coccidiostáticos na ração de frangos (Wang e Sporns, 2000), na identificação das proteínas do plasma seminal de

galos (Marzoni *et al.*, 2013), no estudo do perfil das proteínas encontradas na membrana da casca do ovo fértil (Rath *et al.*, 2017), e mais recentemente, na identificação de bactérias a partir de diferentes amostras (Holl *et al.*, 2016; Karunarathna *et al.*, 2017; Shell *et al.*, 2017). A seguir, são apresentados alguns trabalhos em que a técnica MALDI-TOF foi empregada em estudos microbiológicos.

Holl *et al.* (2016) determinaram os micro-organismos deteriorantes da carne do peito de frango sem pele, embalado em atmosfera modificada (baixa concentração de oxigênio e alta concentração oxigênio) por meio da técnica MALDI-TOF MS. Os autores estudaram também a dinâmica de crescimento desses micro-organismos ao longo dos dias de armazenamento (até 14 dias) e em duas temperaturas (4 e 10°C). A microbiota autóctone foi influenciada pela atmosfera em que a carne foi embalada assim como pela temperatura e período de armazenamento. Nesse estudo, *Bronchothrix thermosphacta* e *Carnobacterium* sp. foram as bactérias mais abundantes quando a carne foi armazenada a 4°C e embalada em atmosfera com alta concentração de O₂. A 10 °C, nestas mesmas condições, observou-se uma deterioração mais rápida da carne com produção de odores fortes causados principalmente pelas bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia*. Já as carnes embaladas em atmosfera modificada com baixa concentração de O₂ e refrigeradas a 4°C, a microbiota predominante foi composta por *Carnobacterium* sp., *Serratia* sp. e *Yersinia* sp. e, adicionalmente, *Hafnia alvei* quando armazenadas a 10°C.

A técnica MALDI-TOF foi utilizada em um estudo por Karunarathna *et al.* (2017) para a identificação de bactérias provenientes de ovos não eclodidos de três incubatórios no Canadá. De 889 colônias bacterianas submetidas a análise, 83,13 % (739/889) foram identificadas ao nível de gênero e 67,15% (597/889) ao nível de espécie. Nesse trabalho, 16% (150/889) não foram identificadas, mesmo quando com a realização da extração com ácido fórmico. A maioria das bactérias isoladas pertenciam ao gênero *Enterococcus* (29,71%) seguida por *Escherichia coli* (19,46%). A espécie predominante de *Enterococcus* foi *E. faecalis*. Também, neste trabalho, foi realizada a comparação da técnica MALDI-TOF com a técnica de sequenciamento da 16s rRNA para 20 amostras, cujo resultado foi 100% de compatibilidade.

Shell *et al.* (2017) coletaram 110 amostras provenientes de aves aparentemente saudáveis (31 *swabs* de cloaca), clinicamente doentes (49 *swabs* de cloaca) e de aves mortas que apresentavam congestão hepática e hepatomegalia (30 amostras de fígado e

coração). As amostras seguiram o procedimento padrão para isolamento (pré-enriquecimento, enriquecimento e cultivo em meio seletivo) e identificação de *Escherichia coli* e *Salmonella* (provas bioquímicas e sorológicas), conforme descrito pelos autores. Nesse trabalho, o objetivo dos autores foi comparar esse método tradicional para identificação de *E. coli* e *Salmonella* com a técnica MALDI-TOF (pela extração com ácido fórmico). De todas as amostras positivas para *E. coli* (33), a técnica MALDI-TOF só não conseguiu identificar duas amostras, o mesmo ocorreu para as amostras positivas para *Salmonella* (26), com uma taxa de recuperação de 93,9 e 92,3%, respectivamente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AJEELI, M. N.; TAYLOR, T.M.; ALVARADO, C.Z. et al. Comparison of eggshell surface sanitization technologies and impacts on consumer acceptability. *Poult. Sci.*, v. 95, n. 5, p. 1191–1197, 2016.

ANTON, M.; NAU, F.; NYS, Y. Bioactive egg components and their potential uses. *World's Poultry Sci. J.*, v. 62, n. 3, p. 429–438, 2006.

BAIÃO, N. C.; CANÇADO, S. V. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo. *Cad. Tec. Esc. Vet.*, n.21, p.43-57, 1997.

BAIÃO, N. C.; LÚCIO, C. G. Nutrição de Matrizes Pesadas. In: *Manejo de Matrizes de Corte*. Campinas: FACTA, 2005. Cap.10, p.197-216.

BAILEY, J. S.; COX, N. A. AND BERRANG, M. E. Bactericidal Treatment of Hatching eggs III: Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 10, p. 117–120, 2001.

BAKER, R.C. Microbiology of eggs. *J. Milk Food Technol.*, v.37, p. 265-268, 1974.

BARBOSA, V.M. A casca do ovo e sua relevância no processo de incubação. In: BARBOSA, V.M.; LARA, L.J.C.; MENDES, P.M.M. *Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário*. Belo Horizonte: FEP MVZ, 2011. Cap.2, p.11-36.

BELL, D. D. Formation of the egg. In: BELL, D. D.; JUNIOR WEAVER, W. D. *Commercial chicken meat and egg production*. 5ed. Springer: New York, 2001. p. 59-69.

BENAGLI, C., ROSSI, J., DOLINA, M. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. *Plos One*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2011.

BERRANG, M. E.; FRANK, J.F.; BUHR, R.J. et al. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the egg production period. *J. Appl. Poul. Res.*, v. 6, n. 3, p. 298–305, 1997.

BERRANG, M. E.; COX, N.A.; FRANK, J.F. et al. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: A review. *J. Appl. Poul. Res.*, v. 8, n. 4, p. 499–504, 1999.

BERRANG, M. E.; COX, N.A.; FRANK, J.F. et al. Prevention or Reduction of Human.

J. Appl. Poul. Res., v. 9, p. 279–284, 2000.

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.

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, Distrito Federal.

BRAUN, P. G.; FERNANDEZ, N.; FUHRMANN, H. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone: Science and Engineering*, v. 33, n. 5, p. 374–378, 2011.

BUHR, R. J.; SPICKLER, J.R.; RITTER, A.R. et al. Efficacy of combination chemicals as sanitizers of Salmonella -inoculated broiler hatching eggshells 1. *J. Appl. Poul. Res.*, v. 22, n. January, p. 27–35, 2013.

CARBONELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E. et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.*, v. 44, p. 104-109, 2011.

CARDICI, S. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Arch.Geflügelk.* v.73, n.2, p.116–123, 2009.

CHAVEZ, C.; KNAPE, K.D; COUFAL, C.D. et al. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.*, v. 81, n. 8, p. 1132–1135, 2002.

CLARK, A. E.; KALETA, E. J.; ARORA, A. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

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. bra.*, v. 53, p. 1177-1183, 2018.

CONY, H. C.; VIEIRA, S.L.; BERRES, J. et al. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Ciênc. Rural*, v. 38, n. 5, p. 1407–1412, 2008.

COX, N. A.; BERRANG, M. E.; CASON, J. A. Salmonella penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs - A review. *Poult. Sci.*, v. 79, n. 11, p. 1571–1574, 2000.

DE REU, K.; GRIJSPEERDT, K.; MESSENS, W. et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella enteritidis*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.112, p.253-260, 2006a.

DE REU, K.; GRIJSEERDT, K.; HERMAN, L. et al. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Letters in App. Microbiol.*, v. 42, n. 2, p. 144–148, 2006b.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodet. and Biodeg.*, v. 41, n. 3–4, p. 261–268, 1998.

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, n. 5, p. 1121–1127, 2009.

FINNEGAN, M.; LINLEY, E.; DENYER, S.P. et al. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: Differences between liquid and gas forms. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 65, n. 10, p. 2108–2115, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Ozone in gaseous and aqueous phase as an antimicrobial agent on food, including meat and poultry. *Fed. Reg.* v.3, n.33829, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Code of Federal Regulation: 21CFR173.315, 2018.

FOX, A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present and futura. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, n.8, p.2677-2680, 2006.

GENTRY, F.R.; QUARLES, C.L. The measurement of bacterial contamination on egg shells. *Poult. Sci.*, v.51, p. 930-933, 1972.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; SHAHZAMANI, S.; YAZDKHASTI, M. Comparison of Virkon S® and formaldehyde on hatchability and survival rate of chicks in disinfection of fertile eggs. *Revue Med. Vet.*, v.167, n.1, p.45-49, 2016.

GOTTSELIG, S. M.; DUNN-HORROCKS, S.L.; WOODRING, K.S. et al. Advanced oxidation process sanitization of eggshell surfaces. *Poult. Sci.*, v. 95, n. 6, p. 1356–1362, 2016.

HAINES, R.B. Observation on the bacterial flora of the hen's egg with a description of new species of *Proteus* and *Pseudomonas* causing rot in eggs. *J. Hyg. Camb.*, v.38, p.

338-355, 1938

HOLL, L.; BEHR, J.; VOGEL, R. F. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.*, v. 60, p. 84-91, 2016.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I.; MIYAJI, S. O. Sistema reprodutor e formação do ovo. In: *Manejo da Incubação*. Jaboticabal: FACTA, 2013. Cap.1.1, p.1-30.

KARUNARATHNA, R.; POPOWICH, S.; WAWRYK, M. et al. Increased Incidence of Enterococcal Infection in Nonviable Broiler Chicken Embryos in Western Canadian Hatcherics as Detected by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Avian Dis.*, v.61, n. 4, p.472-480, 2017.

KEITA, A.; HUNEAU-SALAUN, A.; GRULLOT, A. et al. A multi-pronged approach to the search for an alternative to formaldehyde as an egg disinfectant without affecting worker health, hatching, or broiler production parameters. *Poult. Sci.*, v. 95, n. 7, p. 1609–1616, 2016.

KIM, J. G.; YOUSEF, A. E.; DAVE, S. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J. Food Prot.*, v. 62, n. 9, p. 1071–1087, 1999.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. *Environ Int.*, v. 30, n. 1, p. 47–55, 2004.

LAPÃO, C.; GAMA L. T.; SOARES, M. C. Effects of broiler breeder age and length of egg storage on albumen characteristics and hatchability. *Poultry Science*, v. 78, p.640-645, 1999.

LUUKKONEN, T.; TEERINIEMI, J.; PROKKOLA, H. et al. Chemical aspects of peracetic acid based wastewater disinfection. *Water SA*, v. 40, n. 1, p. 73–80, 2014.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D. et al. Revisão. *Quim. Nova*, v. 26, n. 3, p. 373–380, 2003.

MARZONI, N.; CASTILLO, A.; SAGONA, S. et al. A proteomic approach to identify seminal plasma proteins in roosters (*Gallus gallus domesticus*). *Anim. Reprod. Sci.*, v. 140, n. 3, p. 216-223, 2013.

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.

MINE, Y.; OBERLE, C.; KASSAIFY, Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n. 1, p. 249–253, 2003.

MOAT, J.; CARGILL, J.; SHONE, J. et al. Application of a novel decontamination process using gaseous ozone. *Can. J. Microbiol.*, v. 55, n. 8, p. 928–933, 2009.

MUSGROVE, M. T.; STEPHENS, C.B.; BOURASSA, D.V. et al. Enterobacteriaceae and Salmonella recovered from nonsanitized and sanitized broiler hatching eggs. *J. App. Pou. Res.*, v. 23, n. 3, p. 516–522, 2014.

NAVARRO, A. B. R.; GASCA, N. D.; MUNOZ, A. et al. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. *Poultry Science*, v.92, p.3026-3035, 2013.

OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION (OSHA) LABOR. Occupational exposure to formaldehyde: Response to court remand. *Fed. Reg.*, v.56, n.135, p.32302–32318, 1991.

OLSEN, R.; KUDIRKIENE, E.; THOFNER, I. et al. Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poult. Sci.* v.96, p. 3901–3911, 2017.

PREISINGER, R. Innovative layer genetics to handle global challenges in egg production. *Br. poult. sci.*, v.59, n.1, p. 1-6, 2018.

POPPE, C.; JOHNSON, R. P.; FORSBERG, C. M. et al. *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Can.J. Vet. Res.*, v.56, p. 226–232, 1992.

RATH, N. C; LIYANAGE, R.; MAKKAR, S. K. et al. Protein profiles of hatchery egg shell membrane. *Proteome Sci.*, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2017.

REHKOPF, A. C.; BYRD, J.A.; COUFAL, C.D. et al. Advanced Oxidation Process sanitization of hatching eggs reduces Salmonella in broiler chicks. *Poult. Sci.*, v. 96, n. 10, p. 3709–3716, 2017.

REZENDE, A. C. F. D.; ROCHA, A. O. Fatores que influenciam a qualidade da casca dos ovos de matrizes pesadas e principais defeitos macroscópicos descritos: revisão de literatura. 2013. 86p. Trabalho de conclusão de curso, Escola de Veterinária, Pontífica Universidade Católica de Minas Gerais, Minas Gerais.

SAMBERG, Y.; MEROZ, M. Application of disinfectants in poultry hatcheries. *Rev. Sci. Tech. Off. Int.Epiz.*, v. 14, n. 2, p. 365–380, 1995.

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, n. 2, p. 227–233, 1999.

SCUR, M. C.; PINTO, F.G.S.; ZAMPRONIO, E.A. et al. Issn: 2316-4093. *Acta Iguazu*, v. 3, p. 1–10, 2014.

SHELL, W. S.; SAYED, M. L.; ALLAH, F. M. G., et al. Matrix-assisted laser desorption-ionization-time-of-flight mass spectrometry as a reliable proteomic method for characterization of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Vet. World*, v. 10, p. 1083-1093, 2017.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K. et al. MALDI TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.*, v. 6, p. 1-16, 2015.

SILVERSIDES, F.G.; SCOTT, T.A. Effect of storage and layer age on quality of eggs from two lines of hens. *Poultry Science*, v.80, p.1240-1245, 2001.

STALDEMAN, W., J.; COTTERILL, O. J. The microbiology of eggs. In: *Egg Science and technology*. 4ed. 1995. p.88-102.

SWIATKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A.; KRAWCZYK, J. et al. Dietary factors improving eggshell quality: an updated review with special emphasis on microelements and feed additives. *World's Science Poultry Journal*, v.71, p.83-94, 2015.

TONA, K., BRUGGEMAN, V., ONAGBESAN, O. et al. Day-old chick quality: Relationship to hatching egg quality, adequate incubation practice and prediction of broiler performance. *Avian Poult. Bio. Rev.*, v.16, p.109-119, 2005.

TUMOVA, E.; GOUST, R. M. Interaction of hen production type, age, and temperature on laying pattern and egg quality. *Poultry Science*, v.91, p.1269-1275, 2012.

VINAYANANDA, C. O.; FAIROZE, N.; MADHAVAPRASAD, C.B. et al. Studies on occurrence, characterisation and decontamination of emerging pathogenic *Escherichia coli* (STEC, ETEC and EIEC) in table eggs. *Brit. Poult. Sci.*, v. 58, n. 6, p. 664–672, 2017.

WANG, J.; SPORNS, P. MALDI-TOF MS Quantification of Coccidiostats in Poultry Feeds. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, p. 2807-2811, 2000.

WELLMAN-LABADIE, O.; PICMAN, J.; HINCKE, M. T. Avian antimicrobial

proteins: Structure, distribution and activity. *World's Poult. Sci. J.*, v. 63, n. 3, p. 421–438, 2007.

WELLS, J. B.; COUFAL, C.D.; PARKER, H.M. et al. Hatchability of broiler breeder eggs following eggshell sanitization by repeated treatment with a combination of ultraviolet light and hydrogen peroxide. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 10, n. 6, p. 421–425, 2011.

WHISTLER, P. E.; SHELDON, B. W. Environment and Health. *Poult. Sci.*, v. 68, p. 1345–1350, 1989.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J. et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol.*, v.93, p. 965-974, 2011.

CAPÍTULO II - An evaluation of alternative methods for sanitizing hatching eggs

ABSTRACT Different sanitization methods were evaluated as alternatives to formaldehyde fumigation for the reduction of eggshell and yolk sac microbiological counts (n=56), improvement of eggshell quality (n=196), incubation parameters (n=6468) and day-old chick quality(n=91). A total of 10,080 hatching eggs were collected from a 70-wk-old commercial broiler breeder flock and distributed in a completely randomized block design with seven treatments: fumigation with paraformaldehyde (4.63g/m³/30 min; FF), fumigation with ozone (5-15ppm/30 min; FO), ultraviolet light-C irradiation (8.09 mW/cm²; 120 s; UV-C), hydrogen peroxide spraying (3%; 0.69 mL/egg; H₂O₂), peracetic acid spraying (0.3%; 0.69mL/egg; PAA), water spraying (0.69mL/egg; water control - WC), and without disinfection (dry control - DC). Spraying eggs with PAA and UV-C significantly reduced aerobic microorganisms plate counts compared to the DC group. In addition, eggs disinfected with PAA had lower Enterobacteriaceae counts than the DC and WC groups. Eggshell quality, incubation parameters and microbiological counts for yolk sac did not differ (P>0.05) among treatments. This study demonstrated the potential for the application of PAA and UV-C for eggshell disinfection instead of formaldehyde; however, an electronic microscopic evaluation of the eggshell is necessary to determine if these methods cause any damage to the cuticle.

Key-words: bacterial enumeration, eggshell quality, hatchability

INTRODUCTION

Increased demand for antibiotic-free broiler production represents one of the greatest biosecurity challenges for the broiler industry. According to Board and Tranter (1995), the number of eggshell bacterial can vary widely, from hundreds to millions of bacteria/eggshell, with the main contamination sources being: dust, litter and excreta. Reducing microbial contamination on eggshells may help reduce bacterial infection in developing embryos and neonatal chicks (Fasenko et al., 2009). Therefore, efficient cleaning and disinfection programs are fundamental to good performance in the poultry industry, especially when antibiotic-free broiler production has been applied.

According to Bailey et al. (2001), the need to disinfect fertile eggs has been acknowledged since 1908 when fumigation with formaldehyde was used to control microbial populations. However, since the publication of the effects of repeated or prolonged exposure to formaldehyde in 1991 by the Occupational Safety and Health Administration (**OSHA**), several studies have endeavored to find alternative disinfectants. Any such alternative disinfectant should be environment-friendly and not hazardous to human health. The ultraviolet light C (**UV**), hydrogen peroxide (**H₂O₂**), ozone (**O₃**), and peracetic acid (**PAA**) treatments used in the current study meet these requirements. The treatment of UV and H₂O₂ used separately or in combination have been shown to decrease bacterial counts on the eggshell surface (Chavez et al., 2002; De Reu et al., 2006; Buhr et al., 2013; Gottselig et al., 2016; Keita et al., 2016; Rehkopf et al., 2017). On the other hand, using O₃ as an eggshell sanitizer has also been shown to reduce microbial counts, but the effects on hatchability need to be reassessed (Whistler and Sheldon, 1989; Braun et al., 2011). Treatment with PAA has been applied mainly to the disinfection of commercial eggs (Al-Ajeeli et al., 2016; Vinayananda et

al., 2017), and studies evaluating its impact on bacterial count, hatchability and eggshell quality have become necessary.

There is a lack of published research on the combined effects of alternative disinfectants on microbial count, eggshell quality, and hatchability concomitantly, which was the aim of the present study. In addition, this study involved eggs from an old broiler breeder flock in which is expected a high level eggshell contamination, thus increasing the bacterial challenge. Therefore, the purpose of this research was to evaluate the efficacy of alternative methods (O_3 fumigation, UV radiation, H_2O_2 , and PAA spraying) of sanitizing hatching eggs, in comparison to formaldehyde, in the reduction of eggshell microbiological count, and to assess their effects on eggshell quality, hatching results, neonatal chick quality, and microbial contamination of the yolk sac of one day-old chicks.

MATERIALS AND METHODS

All the practices regarding animal management were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) at the Universidade Federal Minas Gerais, under the protocol number 300/2016.

Egg Collection

A total of 10,080 hatching eggs were collected from a 70-wk-old Cobb 500 commercial breeder flock. The eggs originated from the second and third collections of the day. Eggs that were laid overnight and had visible fecal, litter or egg contamination were not used for the experiment. All eggs were collected directly from the nest with disposable gloves. After collection, double yolked, deformed or cracked eggs were excluded. The selected eggs were randomly assigned to disinfection treatments, for a total of 1,440 eggs per treatment. A total of seven treatments, comprising of five

different disinfection procedures and two controls, were employed: fumigation with ozone (**FO**), fumigation with paraformaldehyde (**FF**), radiation with ultraviolet light C (**UV-C**), spraying with hydrogen peroxide (**H₂O₂**), spraying with peracetic acid (**PAA**), spraying with water (**WC**), and without disinfectant (**DC**). The disinfection procedures were performed in a separate room at the farm after each egg collection.

Disinfection Procedures

Ozone. Immediately after allocating the eggs among treatments, the eggs of the ozone treatment were placed in plastic boxes and carried to the fumigation chamber (8.64 m³). The eggs were disinfected with ozone gas (5-15 ppm for 30 minutes) according to the directions of the manufacturer (Alvap Engenharia LTDA, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil) to achieve the desired concentrations. The gas was generated by the passage of compressed oxygen through an ozone generator (Alvap, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil) and the gas levels inside the chamber were measured by an Ozone Analyzer UV-100 (Eco Sensors, Santa Fe, New Mexico). The temperature and relative humidity in the fumigation chamber were kept between 23 to 24°C and 65 to 70%, respectively. After fumigation, the ozone inside the chamber was exhausted until the concentration reached zero. The average total time of exhaustion was five minutes.

Paraformaldehyde. For the paraformaldehyde treatment, eggs were placed in plastic boxes and disinfected in the same chamber (8.64 m³) used for ozone disinfection. Therefore, this treatment was applied one hour later after collection than the other treatments. Fumigation used a paraformaldehyde concentration of 4.63 g/m³ (40 g of paraformaldehyde prills were heated) for 30 minutes followed by a 10 min exhaust period before opening the chamber. The setup ensured that the gas circulated throughout the chamber, with temperature and relative humidity kept between 24.5 to 26°C and 65 to 70%, respectively.

UV-C irradiation. The UV-C treatment was performed (Figure 1) using a custom-built UV chamber, following Coufal et al. (2003) with modifications, with 16 germicidal UV-C lamps (30W, 90 cm, 254nm, HALOTECH). Eggs were placed in a 90-egg custom-built metal wire flat that was designed to minimize contact between the egg and the wire. The eggs were exposed to UV light at a mean intensity of 8.09 mW/cm² for 120 seconds. The UV intensity was measured by a probe (THORLABS S401C, Dachau, Germany) coupled to a digital optical power meter (THORLABS PM100D, Dachau, Germany).

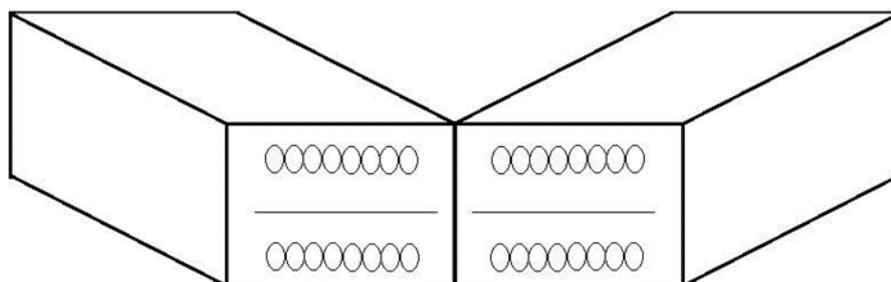


Figure 1. Diagram of custom-built chamber with 16 germicidal UV-C lamps.

Hydrogen Peroxide (H₂O₂). The H₂O₂ treatment was applied to eggs by spraying a fine mist of 3% (1280 ppm) H₂O₂ aqueous solution (Oxivir Five 16 Concentrate, Diversey, Socorro, São Paulo, Brazil) using a hand-held manual sprayer (0.69 ml/egg). The temperature of the solution was recorded by a digital thermometer (Incoterm 5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and was set at 21.5°C. In order to cover the entire surface of the eggs with the solution, the trays with the eggs were placed on a flat surface and sprayed in two steps: half the volume of the disinfectant solution was administered on one side of the eggs, after which the eggs were turned manually, and the remainder of the solution applied to the other surface.

Peracetic acid (PAA). The PAA treatment was applied to eggs by spraying a fine mist of 0.3% PAA (Divosan Forte, Diversey, Socorro, São Paulo, Brazil) using a hand-held manual sprayer. The solution was prepared immediately prior to use by mixing the commercial product with water according to the directions of the manufacturer to achieve the desired concentrations. The spray mode and volume were the same those used in the hydrogen peroxide treatment. The temperature of the solution was recorded by a digital thermometer (Incoterm 5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and ranged from 19.5°C to 20.5°C.

Without disinfection (water control). The same method used for spraying eggs with H₂O₂ and PAA was applied to the eggs of this treatment, although the eggs were sprayed with water. The purpose of this treatment was to detect any mechanical effects that could occur from the washing process. The temperature of the water was recorded by a digital thermometer (Incoterm[®]5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and ranged from 19.5°C to 20.5°C.

Without disinfection (dry control). The eggs of this treatment were kept in the same room in which the other treatments were placed, but they were not submitted to any disinfection procedure or sprayed with water.

Microbial Evaluation

Eggshell. Microbiological evaluation of the eggshell was performed using a method adapted from Fassenko et al. (2009). One hour after disinfection, 16 eggs per treatment per collection were sampled for eggshell microbiological counts for a total of 32 eggs per treatment. The eggs, collected with disposable gloves, were placed in sterile plastic bags (four eggs per bag) and refrigerated at 4°C until being transported to the laboratory (microbiological analyses were performed 24 hours after sampling). Each

bag containing a pool of four eggs was aseptically reopened and the eggs transferred to another sterile plastic bag, in which 250 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) was added. A rinse sample was obtained by massaging the bag for five minutes to remove bacterial cells from the surface of the eggshells. One mL of the resultant rinse solution was diluted serially using PBS. The samples were plated on PCA (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) for total aerobic microorganism counts, MacConkey (BD Difcotm, Sparks, Maryland) for Enterobacteriaceae counts, and Acidified Dextrose Potato Agar (**PDA**) (Himedia, Mumbai, Maharashtra, India) for molds and yeasts counts. All plates, except PDA, were incubated at 37°C for 48 hours prior to counting the resultant colonies. The PDA plates were incubated at room temperature for seven days, after which the colonies were counted and, recorded, and \log_{10} cfu/pool of the four eggs calculated.

Yolk sac. Yolk sac microbiological evaluation was performed using a method adapted from Sander and Wilson (1999). A total of 13 saleable chicks per treatment were randomly chosen and transported to the laboratory for microbiological analysis. At 24 hours post-hatch, the chicks were euthanized by cervical dislocation to aseptically collect the yolk sac. One gram of yolk sac (only the yolk content) per chick was sampled for serial dilution in PBS. A 100 μ l aliquot was plated on Plate Count Agar (PCA) for total aerobic microorganism counts and MacConkey for Enterobacteriaceae counts. All plates were incubated at 37°C for 48 hours prior to counting the resultant colonies which were the counted and recorded as \log_{10} cfu/yolk sac.

Eggshell Quality

Eggshell strength. To evaluate eggshell strength, 28 eggs were sampled per treatment after disinfection. The method used is based on breaking force (kg), which is

defined as the compression force required to fracture an eggshell at a constant compression speed. A TA[®]XT 2 Texture Analyzer texturometer (Stable Micro Systems Ltd., Hamilton, MA) was used for determining eggshell breaking strength according to Stefanello et al. (2014). The method applied was the breakage force puncture test, which measures the strength of impact to an egg by recording the force on the shell throughout impact. The eggs were placed horizontally between a steel puncture probe (4 mm diameter P4 DIA Cylinder) and a porcelain crucible. The distance between the punch and the egg was 6 mm and the speed pre, during, and post-test was 3.0, 0.5, and 5.0 mm/s, respectively. The trigger force of the punch was 3.0 g. The eggshell was pressed until a fracture occurred, and with the force necessary, recorded as kg/mm² being indicative of resistance.

Eggshell thickness. To evaluate eggshell thickness, another 28 eggs were sampled per treatment after disinfection. The eggshells were washed and dried at room temperature for three days prior to measuring thickness in millimeters using a digital micrometer (Mitutoyo, 0.001mm, Americana, São Paulo, Brazil) at three points: bottom (blunt end), equatorial and apex (pointed end) which were then averaged.

Incubation and Hatching

One day after disinfection, the eggs were transported to the commercial hatchery. During this storage period the eggs remained at 22 to 24°C with 55 to 60% humidity overnight at the breeder farm. At the hatchery, all non-hatching eggs (dirty, double yolked, misshapen, cracked and small) were removed and the remaining eggs were placed in trays, with a capacity of 77 eggs each, according to the treatments. Each treatment had 12 trays, six for the second collection of the day and six for the third collection day, totalizing 924 eggs per treatment. The eggs remained under these conditions in the storage room with the temperature ranging from 18 to 22°C for another

day. Each tray was individually weighed prior to incubation. The eggs from the seven treatments were randomly incubated together at 37.4°C (99.3°F) and relative humidity set at 62% (84°F) in a multi stage incubator (Casp CMG 125E, Amparo, São Paulo, Brazil), with a capacity of 124,416 eggs. Trays representing all treatment combinations were equally distributed throughout all the areas of the machine to account for any positional effects, such as those due to differences in air flow. Eggs were turned at an angle of 45° at a frequency of 24 times a day. At the 14th day of incubation, all eggs were candled to remove the infertile eggs and eggs with early embryonic mortality. The eggs were transferred from the incubator to the hatcher (Casp 21E, Amparo, São Paulo, Brazil) after 456 hours of incubation (19 days), at which time all of the trays were individually weighed to measure egg weight loss during incubation. The eggs were transferred from the trays to hatcher baskets, which were labeled according to treatments. All hatcher baskets were randomly distributed inside the hatchery and kept at an average temperature and a relative humidity of 36.6°C (98°F) and 65%, respectively.

After 21 days of incubation, all hatched chicks were removed from the hatcher, counted, weighed and placed in boxes properly identified according to treatments. Chick quality was visually assessed, and chicks deemed not saleable according to the commercial hatchery standards (chicks with unhealed navels, red hocks or obvious abnormalities) were recorded. Unhatched eggs were counted, opened and examined macroscopically to determine infertility percentage, percentage of embryonic mortality [early (0 to 7 d), middle (8 to 14 d), and late (15 to 21 d plus pipped)], and hatchability percentage of fertile and total eggs, and to record observations of cracked (data not shown) and contaminated eggs. Hatchability was calculated as the number of chicks

hatched per 100 eggs set or per 100 fertile eggs set. No disinfection was performed in the incubator or in the hatcher during the experimental period.

Data Analysis

A complete randomized block design with seven treatments in two blocks (collections as blocks) was used for the microbiological evaluation of the eggshell, eggshell quality and incubation parameters. Analysis of the incubation parameters used 12 replications per treatment in which each tray of 77 eggs constituted a replicate. For analysis of eggshell quality (strength and thickness), each egg was considered a replicate. A completely randomized experimental design was used for bacterial enumeration of yolk sac, with 13 replicates each, in which each chick was considered a replicate. Data were subjected to analysis of variance using the general linear models procedure of SAS software (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Microbiological counts were \log_{10} transformed while hatchability and fertile hatchability were arc sine transformed. Means were tested for significant differences by Tukey's test when the assumptions of normality and homoscedasticity were met. When the test for normality distribution and homogeneity of variance failed, the Kruskal-Wallis test was used. Statistical significance for all tests was considered at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Eggshell Microbial Enumeration

Table 1 shows the results for total aerobic microorganism, Enterobacteriaceae and molds and yeasts on eggshell for different disinfection treatments.

Table 1. Counts of total aerobic microorganisms, Enterobacteriaceae, molds and yeasts on eggshell surface according to disinfection processes.¹

Treatment	Total aerobic microorganisms	Enterobacteriaceae	Molds and yeasts
(log ₁₀ CFU/mL pool of four eggs)			
Formaldehyde	1.85 ±0.27 ^{ab}	1.21 ±0.21 ^{ab}	1.47 ±0.29
O ₃	2.33 ±0.22 ^{ab}	1.54 ±0.16 ^{ab}	1.49 ±0.36
UV-C	1.64 ±0.21 ^a	1.31 ±0.11 ^{ab}	1.33 ±0.28
H ₂ O ₂	2.13 ±0.13 ^{ab}	1.32±0.10 ^{ab}	1.19 ±0.08
PAA	1.48±0.25 ^a	1.00±0.00 ^a	1.17±0.17
WC	2.28 ±0.31 ^{ab}	1.53 ±0.15 ^b	2.41 ±0.32
DC	2.97±0.25 ^b	2.00±0.23 ^b	1.04±0.04
<i>P</i> value	0.002	0.003	0.10

¹ Data are given as treatment means ±SE; O₃= ozone fumigation; UV-C = ultraviolet light radiation; H₂O₂ = spraying with hydrogen peroxide; PAA = spraying with peracetic acid; WC = water control; DC = dry control.

^{a,b} Means in a column not sharing a common superscript are significantly different by Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$).

These results are in agreement with the study of Board and Tranter (1995) who reported that bacterial counts for eggshell surface can vary from hundreds to millions of bacteria/eggshell. The low microorganism load demonstrates that the breeder farm has a good hygienic status.

The aerobic microorganism populations on eggshells was reduced ($P = 0.002$; Table 1) by UV-C and PAA when compared to DC, and were similar to the FF, FO, H₂O₂, and WC treatments. These last four treatments, however, were also similar to the DC treatment (Table 1). UV-C light radiation has been shown to be effective in reducing microbial contamination of the surface of eggs (Chavez et al., 2002; De Reu et al., 2006), which is reinforced by the present results. According to Cardici (2009), the activity of any disinfection process that uses a vapor phase disinfectant (FF and FO), is

influenced by relative humidity (RH) because the gas particles are carried by water droplets. Thus, to reach a satisfactory reduction in microbial count on eggshells using formaldehyde it is important to maintain a high RH (75% or more) during fumigation. Likewise, Braun et al. (2011) reported that ozone disinfection is positively affected by a high relative humidity. Although relative humidity inside the fumigation chamber ranged from 65 to 70% during formaldehyde and ozone disinfection, these treatments failed to achieve a significant reduction of the eggshell microbial count. Eggs disinfected with H₂O₂ had a mean total aerobic microorganism count of $2.13 \pm 0.13 \log_{10}$ cfu/pool of four eggs. This result is consistent with Keita et al. (2016), who observed that egg disinfection by nebulization with H₂O₂ (6%) was not able to reduce the aerobic microorganism population on eggshell. The total aerobic microorganism count was significantly lower for the PAA treatment than for the DC treatment. Although, it is considered a strong disinfectant with a wide spectrum of antimicrobial activity, few studies on the application of PAA to hatching eggs are available in the literature (Kitis, 2004; Cox et al., 2007).

Counts of Enterobacteriaceae decreased significantly ($P = 0.003$; Table 1) after disinfection with PAA, when compared with the WC and DC treatments, but did not differ statistically from the other disinfection processes. The amount of Gram-positive bacteria on eggshell surface is greater than that of Gram-negative bacteria (Mine et al., 2003). Since Enterobacteriaceae are Gram-negative, and hygienic status of the breeder farm was considered good, lower counts for this group of bacteria were expected. The fact that eggs disinfected with PAA had lower bacterial counts for total aerobic microorganism and Enterobacteriaceae compared to the control groups, highlights the broad action spectrum of this disinfectant. No significant differences in eggshell counts of molds and yeasts were observed among the treatments ($P = 0.10$; Table 1). According

to Board and Tranter (1995), egg contamination with molds and yeasts is associated with very humid environments, which was not the case in the present study.

Eggshell Quality

None of the treatments had an effect on eggshell thickness ($P = 0.88$; Table 2) or strength ($P = 0.76$; Table 2).

Table 2. Eggshell thickness and strength of eggs submitted to different disinfection processes.¹

Treatment	Eggshell thickness (mm)	Strength (kg/mm)
Formaldehyde	0.365±0.003 ^a	4.44±0.130 ^a
O ₃	0.365±0.003	4.19±0.135
UV	0.365±0.002	4.30±0.131
H ₂ O ₂	0.362±0.003	4.34±0.117
PAA	0.364±0.002	4.43±0.173
Water control	0.362±0.003	4.12±0.123
Dry control	0.360±0.002	4.28±0.133
<i>P</i> -value	0.88	0.76

¹ Data are given as treatment means ±SE; O₃= ozone fumigation; UV-C = ultraviolet light radiation; H₂O₂= spraying with hydrogen peroxide; PAA = spraying with peracetic acid; WC = water control; DC = dry control.

^a No significant differences exist between means ($P > 0.05$) by Tukey's or Kruskal-Wallis test.

The absence of any significant differences for eggshell thickness indicates that none of the tested procedures have negatively affected this variable. Since thickness is directly related to eggshell strength (Roberts, 2004), the absence of any statistical difference among treatments for strength was expected. According to Samiullah et al.

(2013), it is difficult for bacteria to move across a good quality intact eggshell. However, small defects in the eggshell may provide ways for the predominant bacterial species on an eggshell to penetrate it and reach the contents of the egg (De Reu et al., 2006). A reduction in eggshell thickness due to the action of the disinfectants could compromise its resistance and lead to a higher incidence of breaks and/or bacterial penetration during incubation, which could affect embryonic viability (Climaco, et al., 2018), although, this was not observed in the present study. De Reu et al. (2006) evaluated correlations between bacterial penetration of eggshell and various eggshell characteristics and bacterial strains. The authors inoculated agar-filled eggs by immersion in PBS solution containing the strains of bacteria selected for study and then measured eggshell penetration on the 21st day (post-inoculation). No significant differences were observed between eggshell thickness or number of pores and the presence or absence of eggshell penetration by the bacteria.

Hatching Results

Initial egg weights ($P = 0.39$; Table 3) and final egg weights ($P = 0.36$; Table 3) did not differ among treatments.

Table 3. Egg weight before setting and during transfer, and percentage of egg weight loss, for eggs submitted to different disinfection processes.¹

Treatment	Egg weight before		
	setting (g)	Egg weight during transfer(g)	Egg weight loss ² (%)
Formaldehyde	70.36±0.17 ^a	62.69±0.21 ^a	10.91±0.13 ^a
O ₃	70.75±0.20	62.94±0.42	11.04±0.47
UV	70.60±0.14	63.08±0.16	10.63±0.16
H ₂ O ₂	70.30±0.17	62.73±0.19	10.76±0.19
PAA	70.56±0.19	62.81±0.18	10.97±0.18
Water control	70.29±0.24	62.34±0.27	11.30±0.13
Dry control	70.60±0.18	63.12±0.22	10.66±0.12
<i>P</i> -value	0.39	0.36	0.06

¹ Data are given as treatment means ±SE; O₃= ozone fumigation; UV-C = ultraviolet light irradiation; H₂O₂ = spraying with hydrogen peroxide; PAA = spraying with peracetic acid; WC = water control; DC = dry control.

²Egg weight loss= [(initial egg weight – egg weight during transfer)/initial egg weight]x100.

^a No significant differences exist between means ($P > 0.05$) by Tukey's or Kruskal-Wallis test.

The disinfection processes did not affect ($P = 0.06$; Table 3) percentage of egg weight loss during incubation, with values ranging from 10.63% to 11.30%. This result was expected, since all eggs were incubated in the same machine at the same temperature, and transferred to the hatcher at the same time. However, the application of sanitizers, especially by spray, could affect the cuticle and, consequently, eggshell permeability and embryonic development (Brake and Sheldon, 1990). Eggshell permeability can be measured by egg weight loss during incubation. Thus, according to

our findings, it seems that the cuticle was not damaged by any of the disinfection processes. Nonetheless, eggshell ultrastructure needs to be evaluated to be sure that the cuticle is not being damaged during these procedures.

Hatchability of total and fertile eggs were not affected by the disinfection processes, nor the embryonic mortality (all stages) and percentage of contaminated eggs (Table 4).

Table 4. Percentage of total hatchability, hatchability of fertile eggs, embryonic mortality and, contaminated eggs for eggs submitted to different disinfection processes¹

Treatment	Hatch (%)	Hatch Fert ² (%)	Early Dead(%)	Mid Dead (%)	Late Dead (%)	Cont. (%)
Formaldehyde	83.55±2.00 ^a	86.42±1.93 ^a	6.27±0.86 ^a	0.32±0.17 ^a	3.03±0.68 ^a	2.05±0.57 ^a
O ₃	83.55±1.43	86.64±1.44	6.17±0.85	0.21±0.22	2.81±0.67	1.40±0.30
UV	85.38±1.59	87.57±1.59	6.06±1.26	0.54±0.19	2.16±0.46	1.62±0.48
H ₂ O ₂	84.30±1.38	86.37±1.38	7.03±0.77	0.11±0.11	2.05±0.56	2.16±0.60
PAA	86.13±1.14	88.23±1.14	6.71±0.73	0.32±0.17	1.95±0.41	1.95±0.54
Water control	84.40±1.50	86.46±1.46	6.17±0.97	0.10±0.11	2.05±0.46	2.70±0.60
Dry control	82.20±2.66	84.61±2.67	6.02±0.99	0.59±0.36	3.30±0.92	2.58±0.90
<i>P</i> -value	0.61	0.78	0.89	0.35	0.81	0.88

¹ Data are given as treatment means ±SE; O₃= ozone fumigation; UV-C = ultraviolet light irradiation; H₂O₂ = spraying with hydrogen peroxide; PAA = spraying with peracetic acid; WC = water control; DC = dry control; Hatch = total hatchability; Hatch fert = hatchability of fertile; Cont = contaminated.

²Hatchability of fertile eggs = (total of eggs hatched/total of fertile eggs setted) x 100.

^a No significant differences exist between means ($P > 0.05$) by Tukey's or Kruskal-Wallis test.

The results of total hatchability ($P = 0.61$) and hatchability of fertile eggs ($P = 0.78$) revealed that none of the disinfection procedures negatively or positively affected these variables. Rehkopf et al. (2017) evaluated an automated H₂O₂ (3.2%)/UV (10 mW/cm²) advanced oxidation process applied to broiler hatching eggs and its effects on

hatchability and found no negative or positive effects. However, negative effects on egg hatchability were found for eggs disinfected with ozone (3.03% for two hours) and formaldehyde (7.7 g/m³) (Whistler and Sheldon, 1989; Cony et al., 2008). According to Gholami-Ahangaran et al. (2016), the compositions and dilution of the disinfectants, as well as duration of exposure, are important because they can affect hatching parameters, which may explain the difference between our findings and those from the literature.

Embryonic mortality was not affected by the treatments ($P > 0.05$; Table 4). According to Boleli (2013), the main causes of embryonic mortality are related to improper incubation temperature and humidity, egg contamination and vitamins deficiencies (B2, B5 and D). Since all of the eggs of the present study were incubated in the same machine, the broiler breeders received the same feed and there were no differences in the percentage of contaminated eggs, differences among treatments were not expected. Although formaldehyde is a strong antimicrobial sanitizer it can cause death of embryos when used improperly (Gholami-Ahangaran et al., 2016). Likewise, Cony et al. (2008) showed that eggs disinfected with formaldehyde had higher embryonic mortality (in the period from four to seven days) compared to those disinfected with quaternary ammonia (800 ppm). Although no detrimental effects were found in the embryos that came from eggs disinfected with formaldehyde in the present study, evaluate alternative methods for sanitizing eggs should be evaluated since occupational exposure to formaldehyde can be hazardous to human health.

The disinfection processes had no positive or negative effect on chick weight ($P = 0.45$), percentage of saleable chicks ($P = 0.42$), total aerobic microorganism ($P = 0.18$) and Enterobacteriaceae ($P = 0.20$) yolk sac counts in one-day-old chicks (Table 5).

Table 5. Chick weight, percentage of salable chicks, total aerobic microorganisms and Enterobacteriaceae counts in yolk sac according to disinfection processes.¹

Treatment	Chick Weight (g)	Salable Chicks (%)	Microbiological enumeration of yolk sac (log ₁₀ CFU/mL)	
			Total aerobic microorganisms	Enterobacteriaceae
Formaldehyde	47.65±0.31 ^a	98.61±0.39 ^a	2.53±0.58 ^a	2.51±0.55 ^a
O ₃	48.05±0.46	97.13±0.84	3.27±0.55	2.96±0.41
UV	47.84±0.39	98.43±0.48	4.40±0.41	3.88±0.52
H ₂ O ₂	48.03±0.26	99.21±0.24	3.01±0.55	2.83±0.55
PAA	48.20±0.24	98.86±0.37	3.88±0.51	3.56±0.51
Water control	48.00±0.43	98.30±0.64	2.80±0.57	2.01±0.57
Dry control	48.74±0.21	98.86±0.41	2.92±0.53	2.31±0.63
<i>P</i> -value	0.45	0.42	0.18	0.20

¹ Data are given as treatment means ±SE; O₃= ozone fumigation; UV-C = ultraviolet light irradiation; H₂O₂ = spraying with hydrogen peroxide; PAA = spraying with peracetic acid; WC = water control; DC = dry control.

^a No significant differences exist between means ($P > 0.05$) by Tukey's or Kruskal-Wallis test.

Chick weight is the most widely used indicator for the assessment of one-day-old chick quality, and several factors can affect it. Alsobayel et al. (2013) demonstrated chick weight at hatching to be significantly affected by breed, breeder age and storage period, which may explain the absence of differences in chick weight in present experiment since all the hatching eggs came from the same flock and had the same storage period. The saleable chicks of the present study were classified as being clean, dry and free of deformities (well-formed beak, normal conformation of legs, and no skin lesions) and with completely sealed navels, with no significant effects on their

percentage due to the disinfection processes. Omphalitis in neonatal chicks is associated with a thickened, inflamed and improperly closed navel, which can contribute to a reduced percentage of saleable chicks. An egg contaminated at the breeder farm can carry an infection into the hatchery and contaminated other eggs and, consequently, other chicks. According to Rai et al. (2005), the common bacteria involved in this process are *Escherichia coli*, *Pseudomonas* and *Proteus* (Rai et al., 2005). However, the low bacterial enumeration found on the surface of eggshells in the present study is indicative of the good hygienic status of the breeder farm, which further explains the high number of saleable chicks. Total aerobic microorganism and Enterobacteriaceae yolk sac counts ranged 2.53 to 4.40 and 2.01 to 3.88 log₁₀ cfu/mL, respectively (Table 5). Kizerwetter-Świda and Binek (2008) enumerated and identified bacteria in caecal contents, liver and yolk sac of chicken embryos and newly hatched chicks. The populations of *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. and *Staphylococcus* spp. in newly hatched chicks numbered 4.09x10⁴, 2.5x10² and 3.05x10³ cfu/g, respectively. These numbers are higher than those of the present study, which was not expected due the fact that the yolk sac was plated in PCA and MacConkey agar (non-selective agar). The significantly lower counts for eggshell microorganisms, in the treatments with PAA and UV, were not accompanied by lower counts of microorganisms in the yolk sac of the chicks, probably because all chicks hatched in the same machine.

In conclusion, due to their significant bactericidal effect on the eggshell, and the absence of negative effects on eggshell quality and incubation parameters, UV-C and PAA are indicated as effective alternatives for disinfecting hatching eggs in old broiler breeder flocks. However, eggshell ultrastructure assessments are necessary to determine whether these treatments affect the cuticle. Even though undisinfected eggs did not have lower incubation parameters than the disinfection treatments, disinfection immediately

after laying is strongly recommended in order to avoid any microbial challenge present in the hatchery environment. Future studies are needed to determine if the alternative disinfectants tested have differential effects when applied to eggs collected directly from the litter.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the assistance of Pró-Reitoria de Pesquisa at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for providing funds for publication. We also wish to acknowledge Cobb for its financial support and Rafael Carreon for his technical support. We appreciate the collaboration of the participating industry, and we are thankful to the farm, hatchery managers (Antônio and Clever), and the veterinarian Leonardo Ruiz for dedicating the time and effort to conduct this research. We are grateful to Marcelo Resende for his useful comments and help in laboratory examinations. Finally, the authors thank CAPES for the granted scholarship.

REFERENCES

- Al-Ajeeli, M. N., T. M. Taylor, C. Z. Alvarado, and C. D. Coufal. 2016. Comparison of eggshell surface sanitization technologies and impacts on consumer acceptability. *Poult. Sci.* 95:1191–1197.
- Alsobayel, A. A., M. A. Almarshade, and M. A. Albadry. 2013. Effect of breed, age and storage period on egg weight, egg weight loss and chick weight of commercial broiler breeders raised in Saudi Arabia. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 12:53-57.
- Bailey, J. S. Cox, N. A. and Berrang, M. E. 2001. Bactericidal Treatment of Hatching eggs III: Effect of organic contaminants on efficacy of egg sanitizers. *J. Appl. Poult. Res.* 10:117–120.

- Brake, J. and B. W. Sheldon. 1990. Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss and hatchability. *Poult. Sci.* 69:517-525.
- Braun, P. G., N. Fernandez, and H. Fuhrmann. 2011. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone Sci. Eng.* 33:374–378.
- Board, R.G. and H. S. Tranter. 1995. The microbiology of eggs. Pages 81-104 in *Egg Science and Technology*. W. J. Staldeman and O. J. Cotterill, 4th ed. Binghamton, New York.
- Boleli, I. C. 2013. Estresse, mortalidade e malformações: princípios básicos e implicações para o sucesso da incubação. Pages 177-202 in *Manejo da Incubação*. M. Macari, E. Gonzales, I. S. Patrício, I. A. Naas and P. C. Martins, 3rd ed. Facta, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.
- Buhr, R., J. Spickler, A. Ritter, D. V. Bourassa, N. A. Cox, L. J. Richardson and J. L. Wilson. 2013. Efficacy of combination chemicals as sanitizers of *Salmonella*-inoculated broiler hatching eggshells. *J. Appl. Poult. Res.* 22:27-35.
- Cardici, S. 2009. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation—a review. *Arch. Geflügelk* 73:116–123 .
- Chavez, C., K. D. Knape, C. D. Coufal, and J. B. Carey. 2002. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.* 81:1132–1135.
- Climaco, W. L. S., E. F. Melo, D. P. Vaz, M. M. Saldanha, M. F. V. S. Pinto, L. C. C. Fernandes, N. C. Baião, L. G. Oliveira, F. M. Sant'anna, M. R. Souza, L. J.C. Lara. 2018. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesq. agropec. bra.* 53:1177-1183.
- Cony, H. C., S. L. Vieira, J. Berres, H. A. Gomes, J. L. B. Coneglian, and D. M. Freitas. 2008. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos

incubáveis. Ciênc. Rural 38:1407–1412.

Coufal, C. D., C. Chavez, K. D. Knape and J. B. Carey. 2003. Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 82:754-759.

Cox, N.A., L. J. Richardson, R. J. Buhr, M. T. Musgrove, M. E. Berrang and W. Bright. 2007. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. *J. Appl. Poult. Res.* 16:623-627.

Fasenko, G. M., E. E. O’Dea Christopher, and L. M. McMullen. 2009. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.* 88:1121–1127.

Gholami-Ahangaran, M., S. Shahzamani, and M. Yazdkhasti. 2016. Comparison of Virkon S ® and Formaldehyde on hatchability and survival rate of chicks in disinfection of fertile eggs. *Rev. Med. Vet.* 167:45–49.

Gottselig S. M.; S. L. Dunn-Horrocks; K. S. Woodring; C. D. Coufal and T. Duong. 2016. Advanced oxidation process sanitization of eggshell surfaces. *Poult. Sci.* 95:1356–1362.

Keïta, A., A. Huneau-Salaün, A. Guillot, P. Galliot, M. Tavares, and J. Puterflam. 2016. A multi-pronged approach to the search for an alternative to formaldehyde as an egg disinfectant without affecting worker health, hatching, or broiler production parameters. *Poult. Sci.* 95:1609–1616.

Kitis, M. 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. *Environ. Int.* 30:47–55.

Kizerwetter-Świda, M., and M. Binek. 2008. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *J. Anim. Feed Sci.* 17:224–232 .

Mine, Y., C. Oberle and Z. Kassaify. 2003. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *J. Agric. Food Chem.* 51:249-253.

Occupational Safety and Health Administration (OSHA) Labor. 1991. Occupational exposure to formaldehyde: Response to court remand. 29 CFR 1910.1048. Fed. Reg. 56:32302–32318.

Rai, M. F., S. A. Khan, A. Aslam, and K. Saeed. 2005. Effects of Yolk Sac Infection in Chicken. *Avian Poult. Biol. Rev.* 16:87–93.

Rehkopf, A. C., J. A. Byrd, C. D. Coufal, and T. Duong. 2017. Advanced Oxidation Process sanitization of hatching eggs reduces *Salmonella* in broiler chicks. *Poult. Sci.* 96:3709–3716.

De Reu, K., K. Grijspeerdt, L. Herman, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, J. Debevere, F. Putirulan, and N. M. Bolder. 2006. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:144–148.

Roberts, J. R. 2004. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *J. Poult. Sci.* 41:161-177.

Samiullah, K. K. Chousalkar, J. R. Roberts, M. Sexton, D. May, A. Kiermeier. 2013. Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* *Infantis* penetration. *Int. J. Food.* 165: 77–83.

Sander, J. E., J. L. Wilson. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. 1999. *Avian Dis.* 43:227–233.

Stefanello, C., T. C. Santos, A. E. Muramaki, E. N. Martins and T. C. Carneiro. 2014. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poult. Sci.* 93:104-113.

Vinayananda, C. O., N. Fairoze, C. B. Madhavaprasad, S. M. Byregowda, C. S. Nagaraj, P. Bagalkot, and N. Karabasanavar. 2017. Studies on occurrence, characterisation and decontamination of emerging pathogenic *Escherichia coli* (STEC, ETEC and EIEC) in table eggs. *Br. Poult. Sci.* 58:664–672.

Whistler, P. E., and B. W. Sheldon. 1989. Bactericidal activity, eggshell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult. Sci.* 68:1074–1077.

CAPÍTULO III – Effect of disinfection of hatching eggs on eggshell and yolk sac microbiota

ABSTRACT The aim of this study was to evaluate the effect of different disinfection procedures on the microbiota from eggshell surface and yolk sac of day-old chicks. Hatching eggs were collected from a 70-wk-old commercial broiler breeder flock and distributed in a completely randomized block design with seven treatments: fumigation with paraformaldehyde (4.63g/m³/30 min; FF), fumigation with ozone (5-15ppm/30 min; FO), ultraviolet light-C irradiation (8.09 mW/cm²; 120 s; UV-C), hydrogen peroxide spraying (3%; 0.69 mL/egg; H₂O₂), peracetic acid spraying (0.3%; 0.69mL/egg; PAA), water spraying (0.69mL/egg; water control - WC), and without disinfection (dry control - DC). Culture-dependent methodology was carried out to isolate the microorganisms from eggshell surface (n=224) and yolk sac in one-day-old chicks (n=91), followed by identification by mass spectrometry (MALDI-TOF). The Proteobacteria phylum was dominant on eggshell surface and in the yolk sac. Nineteen genera of bacteria were identified on eggshell surface and the genus *Staphylococcus* (18%) had a higher relative frequency. In the yolk sac, 12 genera of bacteria were identified and the bacterium of *Escherichia* (32.6%) had the higher relative frequency. In conclusion, the most abundant bacteria found in eggshell surface and yolk sac were *Staphylococcus* and *Escherichia coli*, respectively. For future studies, it is important to investigate the efficiency of disinfectants against relevant bacteria for poultry industry in order to determine the best antimicrobial agent in each situation. Besides, it is interesting evaluate the microbiota of the chicks and eggs unhatched to stipulate the ones that are involved with decrease hatchability and chick quality.

Key-words: bacterial identification, broiler breeders, MALDI-TOF MS, UV-C.

INTRODUCTION

Disinfection of hatching eggs is a widely procedure applied in order to minimize the effects of eggshell contamination, such as: poor hatchability and decreased chick performance (Olsen et al., 2017). According to Cardici (2009), the most effective way of disinfection of hatching eggs is fumigation with formaldehyde. However, since the publication of the effects of repeated or prolonged exposure to formaldehyde in 1991 by the Occupational Safety and Health Administration (**OSHA**), several studies have endeavored to find alternative disinfectants.

Nevertheless, the evaluation of the efficiency of different disinfection procedures has been limited mainly regarding bacterial counts and its impacts on hatching parameters (Chavez et al., 2002; Gottselig et al., 2016; Keita et al., 2016; Climaco et al., 2018).

The conventional techniques for identification of bacteria are time consuming, costly, and may fail to provide accurate identification of bacteria to species level. However, bacterial identification by molecular approaches, such as universal gene targets, is also time consuming and costly (Karunarathna et al., 2017). The Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (**MALDI-TOF MS**) is a rapid, precise and cost-effective method for bacterial identification (Carbonelle et al., 2011). The method analyzes the mass-to-charge ratio of ionized bacterial protein molecules and produces unique mass-spectral fingerprints of each bacterial isolate. Then, the obtained profiles are compared to a database (Karunarathna et al., 2017). This method could represent a valid and rapid alternative to conventional methods of microorganism identification and may help to decide which sanitizer should be applied considering the bacterium susceptibility for each poultry production system.

In the scientific literature, there are few studies concerning bacterial isolation from eggshells (Haines, 1938 and Olsen et al. 2017). Thereby, the aim of this study was to evaluate the methods for sanitizing hatching eggs (ozone fumigation, formaldehyde fumigation, ultraviolet radiation, hydrogen peroxide and peracetic acid spraying) and its impact on eggshell surface and yolk sac of one-day-old chick microbiota composition.

MATERIALS AND METHODS

All the practices regarding animal management were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) at the Universidade Federal de Minas Gerais, under the protocol number 300/2016.

Egg Collection

A total of 450 hatching eggs were collected from a 70-wk-old Cobb 500 commercial breeder flock. The eggs originated from the second and third collections of the day. Eggs that were laid overnight and had visible fecal, litter or egg contamination were not used for the experiment. All eggs were collected directly from the nest with disposable gloves. After collection, double yolked, deformed or cracked eggs were excluded. The selected eggs were randomly assigned to disinfection treatments, for a total of 65 eggs per treatment. A total of seven treatments, comprising of five different disinfection procedures and two controls, were employed: fumigation with ozone (**FO**), fumigation with paraformaldehyde (**FF**), radiation with ultraviolet light C (**UV-C**), spraying with hydrogen peroxide (**H₂O₂**), spraying with peracetic acid (**PAA**), spraying with water (**WC**), and without disinfectant (**DC**). The disinfection procedures were performed in a separate room at the farm after each egg collection.

Disinfection Procedures

Ozone. Immediately after allocating the eggs among treatments, the eggs of the ozone treatment were placed in plastic boxes and carried to the fumigation chamber (8.64 m³). The eggs were disinfected with ozone gas (5 to 15 ppm for 30 minutes) according to the directions of the manufacturer (Alvap Engenharia LTDA, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil) to achieve the desired concentrations. The gas was generated by the passage of compressed oxygen through an ozone generator (Alvap, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brazil) and the gas levels inside the chamber were measured by an Ozone Analyzer UV-100 (Eco Sensors, Santa Fe, New Mexico). The temperature and relative humidity in the fumigation chamber were kept between 23 to 24°C and 65 to 70%, respectively. After fumigation, the ozone inside the chamber was exhausted until the concentration reached zero. The average total time of exhaustion was five minutes.

Paraformaldehyde. For the paraformaldehyde treatment eggs were placed in plastic boxes and disinfected in the same chamber (8.64 m³) used for ozone disinfection. Therefore, this treatment was applied one hour later after collection than the other treatments. Fumigation used a paraformaldehyde concentration of 4.63 g/m³ (40 g of paraformaldehyde prills were heated) for 30 minutes followed by a 10 min exhaust period before opening the chamber. The setup ensured that the gas circulated throughout the chamber, with temperature and relative humidity kept between 24.5 to 26°C and 65 to 70%, respectively.

UV-C irradiation. The UV-C treatment was performed (Figure 1) using a custom-built UV chamber, following Coufal et al. (2003) with modifications, with 16 germicidal UV-C lamps (30W, 90 cm, 254nm, HALOTECH). Eggs were placed in a 90-egg custom-built metal wire flat that was designed to minimize contact between the egg and the wire. The eggs were exposed to UV light at a mean intensity of 8.09 mW/cm² for 120 seconds. The UV intensity was measured by a probe (THORLABS

S401C, Dachau, Germany) coupled to a digital optical power meter (THORLABS PM100D, Dachau, Germany).

Hydrogen Peroxide (H₂O₂). The H₂O₂ treatment was applied to eggs by spraying a fine mist of 3% (1280 ppm) H₂O₂ aqueous solution (Oxivir Five 16 Concentrate, Diversey, Socorro, São Paulo, Brazil) using a hand-held manual sprayer (0.69 ml/egg). The temperature of the solution was recorded by a digital thermometer (Incoterm 5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and was set at 21.5°C. In order to cover the entire surface of the eggs with the solution, the trays with the eggs were placed on a flat surface and sprayed in two steps: half the volume of the disinfectant solution was administered on one side of the eggs, after which the eggs were turned manually, and the remainder of the solution applied to the other surface.

Peracetic acid (PAA). The PAA treatment was applied to eggs by spraying a fine mist of 0.3% PAA (Divosan Forte, Diversey, Socorro, São Paulo, Brazil) using a hand-held manual sprayer. The solution was prepared immediately prior to use by mixing the commercial product with water according to the directions of the manufacturer to achieve the desired concentrations. The spray mode and volume were the same those used in the hydrogen peroxide treatment. The temperature of the solution was recorded by a digital thermometer (Incoterm 5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and ranged from 19.5°C to 20.5°C.

Without disinfection (water control). The same method used for spraying eggs with H₂O₂ and PAA was applied to the eggs of this treatment, although the eggs were sprayed with water. The purpose of this treatment was to detect any mechanical effects that could occur from the washing process. The temperature of the water was recorded by a digital thermometer (Incoterm[®]5004, São Paulo, São Paulo, Brazil) and ranged from 19.5°C to 20.5°C.

Without disinfection (dry control). The eggs of this treatment were kept in the same room in which the other treatments were placed, but they were not submitted to any disinfection procedure or sprayed with water.

Bacterial isolation

Eggshell. One hour after disinfection, 16 eggs per treatment per collection were sampled for eggshell microbiological isolation for a total of 32 eggs per treatment. The eggs, collected with disposable gloves, were placed in sterile plastic bags (four eggs per bag) and refrigerated at 4°C until being transported to the laboratory (microbiological analyses were performed 24 hours after sampling). Each bag containing a pool of four eggs was aseptically reopened and the eggs transferred to another sterile plastic bag, in which 250 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) was added. A rinse sample was obtained by massaging the bag for five minutes to remove bacterial cells from the surface of the eggshells. One mL of the resultant rinse solution was diluted serially using PBS. The samples were plated on PCA (Oxoid LTD., Basingstoke, Hampshire, England) and MacConkey (BD Difcotm, Sparks, Maryland) for isolation. The plates were incubated at 37°C for 48 hours prior to isolated the selected colonies.

Yolk sac. A total of 13 saleable chicks per treatment were randomly chosen and transported to the laboratory for microbiological analysis. At 24 hours post-hatching, the chicks were euthanized by cervical dislocation to aseptically collect the yolk sac. One gram of yolk sac (only the yolk content) per chick was sampled for serial dilution in PBS. A 100µl aliquot was plated on Plate Count Agar (PCA) and MacConkey for isolation. All plates were incubated at 37°C for 48 hours prior to isolated the selected colonies.

Bacterial Identification

For the determination of the microbiota composition of eggshell surface and yolk sac from chicks at 24 hours post-hatching, the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) technique was applied. A total of 396 colonies with different morphological and pigmentation characteristics were picked from each plate (PCA and MacConkey) and dilution step for each sample. The isolation of these microorganisms was performed by inoculation each colony in 5mL Infusion Brain Heart (BHI) broth and incubation for 24 hours at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Then, aliquots from BHI broth were streaked onto BHI agar and incubated for 20 to 24 hours at $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, to obtain pure colonies. A fresh, single colony of each bacterial strain was spotted using a toothpick into a target steel plate. For each strain, 1 μl of formic acid (70%) and 1 μl of MALDI-TOF MS matrix, consisting of a saturated solution of *a*-cyano-4-hydroxycinnamicid (HCCA) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), were applied to the spot and allowed to air-dry. Spectra were acquired using the FlexControl MicroFlex LT mass spectrometer (Bruker Daltonics). Prior to measurements, calibration was preceded with a bacterial test standard (*E. coli* DH5 alpha; Bruker Daltonics). The Real Time (RT) identification score criteria used were those recommended by the manufacturer: score ≥ 2.000 indicates a species-level identification, score ≥ 1.700 and < 2.000 indicates a genus-level identification, and a score < 1.700 indicates no reliable identification target for each run. The formic-acid extraction method was performed as previously described (Bizzini et al., 2010) for colonies when no reliable identification was obtained.

Data Analysis

A completely randomized experimental design was used for bacterial isolation of eggshell and yolk sac, with 8 (pool of 4 eggs) and 13 replicates respectively, per

treatment. The results of bacteria identification were discussed according to the descriptive statistics.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial identification

Eggshell surface. A total of four phyla were found in the bacterial identification of eggshell surface (Figure 1).

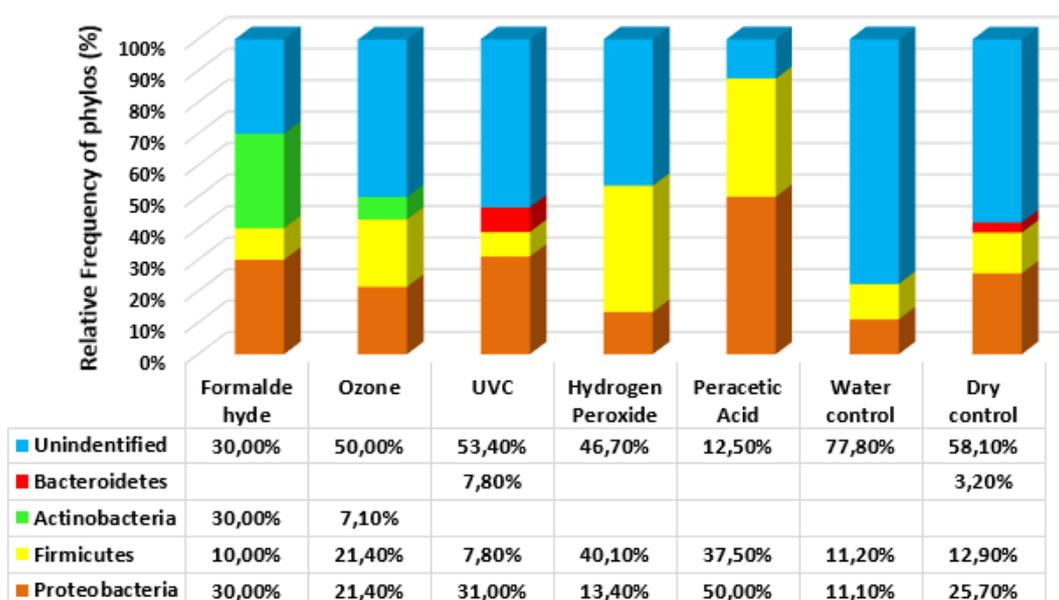


Figure 1. The relative frequency of phyls in eggshell microbiota according to the treatments.

Proteobacteria and *Firmicutes* were the two most dominant phyla found on eggshell surface, although the phyla distribution among the treatments was variable. *Actinobacteria* appeared only in FF and FO treatments with 30 and 7.1% of relative frequency, respectively. The phyla *Bacteroidetes* was found in the UV (7.8%) and the DC (3.2%) treatments. Olsen et al. (2017) evaluated the microbiome of eggshell surface

of visibly clean and dirty eggs, before and after disinfection procedures by 16S rRNA amplicon sequencing. Overall, the eggshell microbiome was dominated by bacteria belonging to the phyla *Firmicutes* (63%), which was different compared to the results found in this study. At the time of laying, approximately 90% of the eggs are free of microorganisms and when bacteria are present their microbiome reflects the status of laying hens (Board and Tranter, 1995; Olsen et al., 2017). Any surface post-laying can be the source of eggshell contamination and according to Board and Tranter (1995) the main sources are: dust, litter and excreta. This is the reason that is so important to maintain high standards of hygiene at the farm, to avoid eggshell contamination (after laying) and re-contamination (after disinfection process).

MALDI-TOF MS allowed identifying a total of 19 bacteria genera in this study at the genus level (Figure 2).

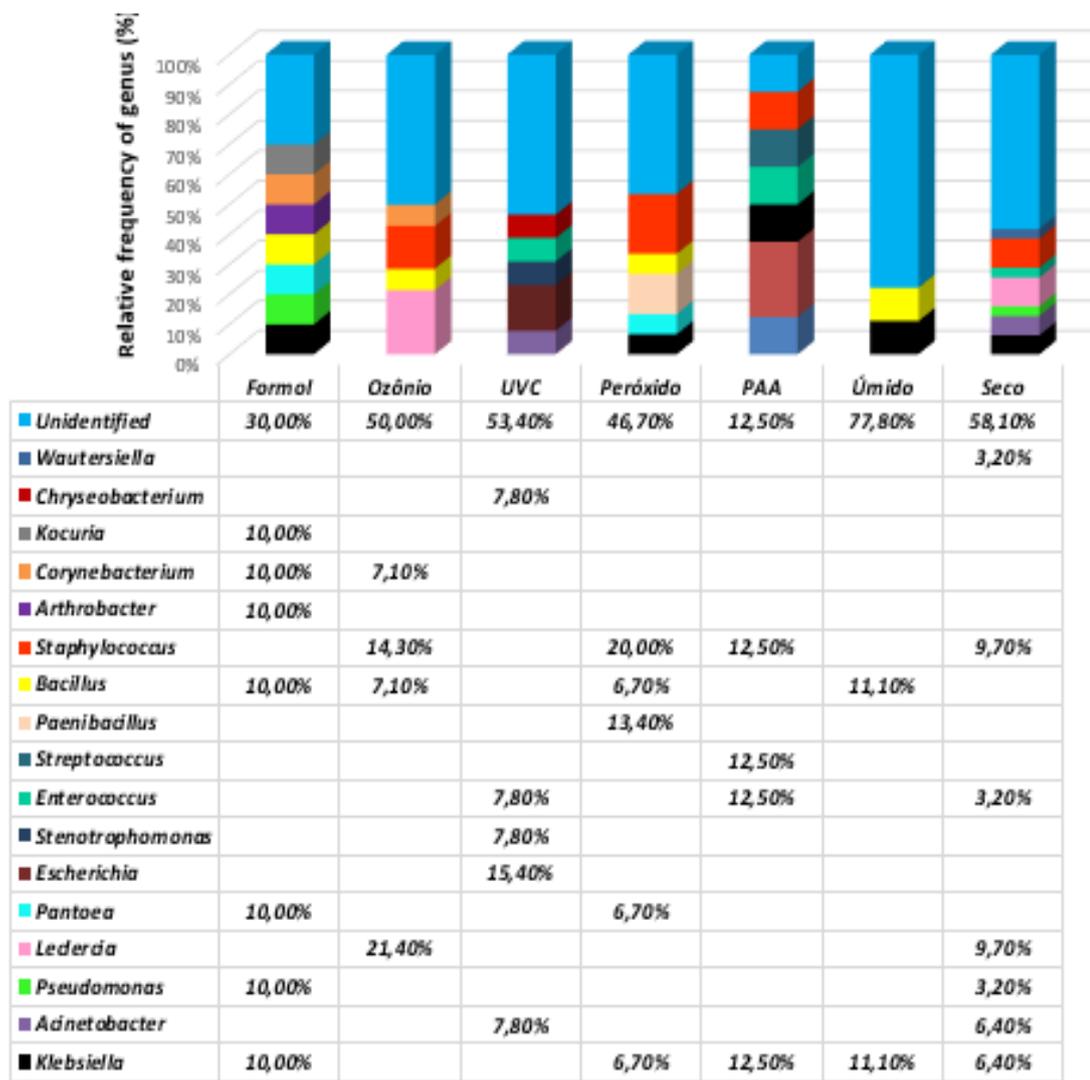


Figure 2. The relative frequency of genera in eggshell microbiota according to the treatments.

Staphylococcus spp. demonstrated to be the main bacterium isolated from eggshell (Figure 2). Haines (1938) found *Bacillus* (24%), *Achromobacter* (19%) and *Micrococcus* (18%) as the most abundant bacteria on eggshells. *Staphylococcus* represented only 5% of the eggshell isolates, differently from that was found in this study (37.2%). However, Board and Tranter (1995) stated that *Micrococcus* were the most prevalent bacterium on eggshell and *Staphylococcus* was also present in low frequency. On the other hand, Cortés et al. (2004) collected samples at the breeder farm and

Staphylococcus (77.3%) was the main bacterium isolated from the nest material, which could explain this genus be the most prevalent bacterium isolated from eggshell surface, since all the samples were collected directly from the nest.

The microbiota of the eggshell is dominated by Gram positive bacteria (Mayes and Takeballi, 1983), which may be related with the contamination sources post-laying. In this experiment, Gram negative and Gram positive bacteria were found in almost the same frequencies: 54% and 46% respectively. According to Mine et al. (2003), Gram positive bacteria are more resistant to desiccation, due to the thickness and chemical composition of their cells walls explaining their higher presence on eggshell surface. More important than identify all bacteria on the eggshell surface is to identify the ones that are involved with spoilage. The most common bacteria isolated from rotten eggs are members of the genera: *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Proteus* and *Aeromonas* (Mayes and Takeballi, 1983). In this study, only *Pseudomonas* (FF, UV, H₂O₂ and DC) and *Alcaligenes* were isolated in low relative frequency, which ranged from 1.16 to 5.81% of the total bacteria isolated (Figure 2), demonstrating the high standards of hygiene at the breeder farm. Bacteria present on eggshell surface can penetrate the egg through pores, especially if there is a differential temperature between the egg and the environment. The results of bacterial invasion could be an embryo contamination, a lower hatchability and an increased number of rotten eggs in the setters (Berrang et al., 1999). Besides, when a rotten egg is contaminated by a gas-producing bacterium, it can explode leading to extensive contamination of others eggs in the setters and hatchers.

Yolk sac. *Proteobacteria* (67.4%), *Firmicutes* (31.3%) and *Actinobacteria* (3.0%) were the three phyla identified in yolk sac in one-day-old chicks (Figure 3). *Actinobacteria* was presented only in FO, H₂O₂ and, PAA treatments (2.4, 2.5 and 1.9% respectively).

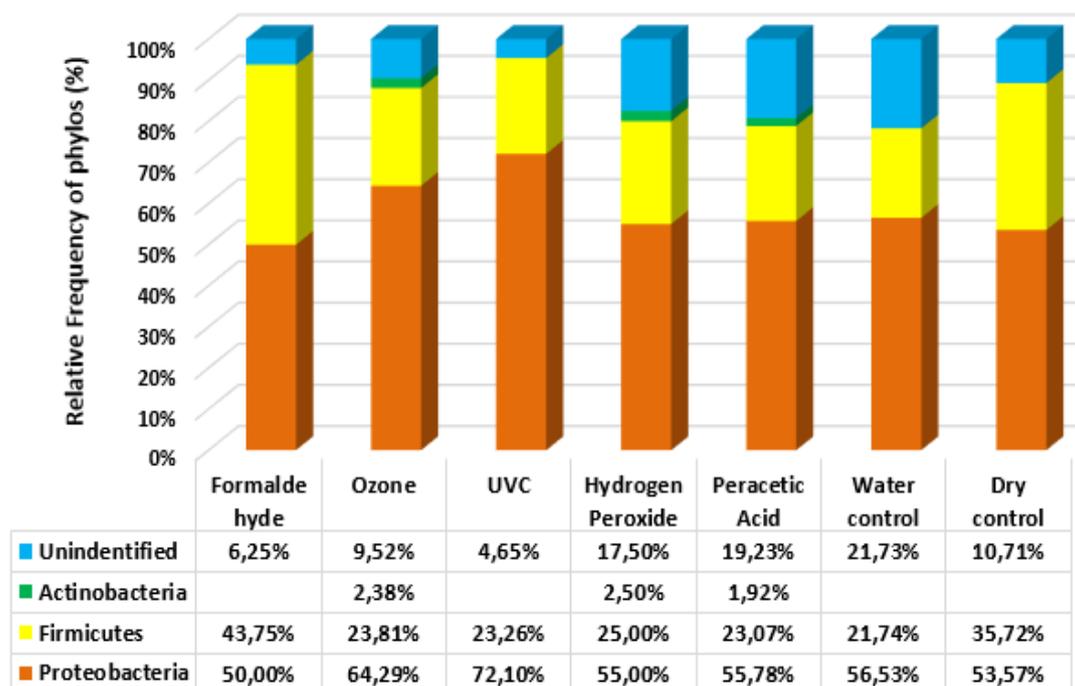


Figure 3. The relative frequency of phylots in yolk sac of newly hatched chicks according to the treatments.

A total of 12 genera were found and *Escherichia* (32.6%), *Enterococcus* (29.5%) and *Enterobacter* (19.4%) (Figure 4) were the dominant genera with slight difference among the treatments.

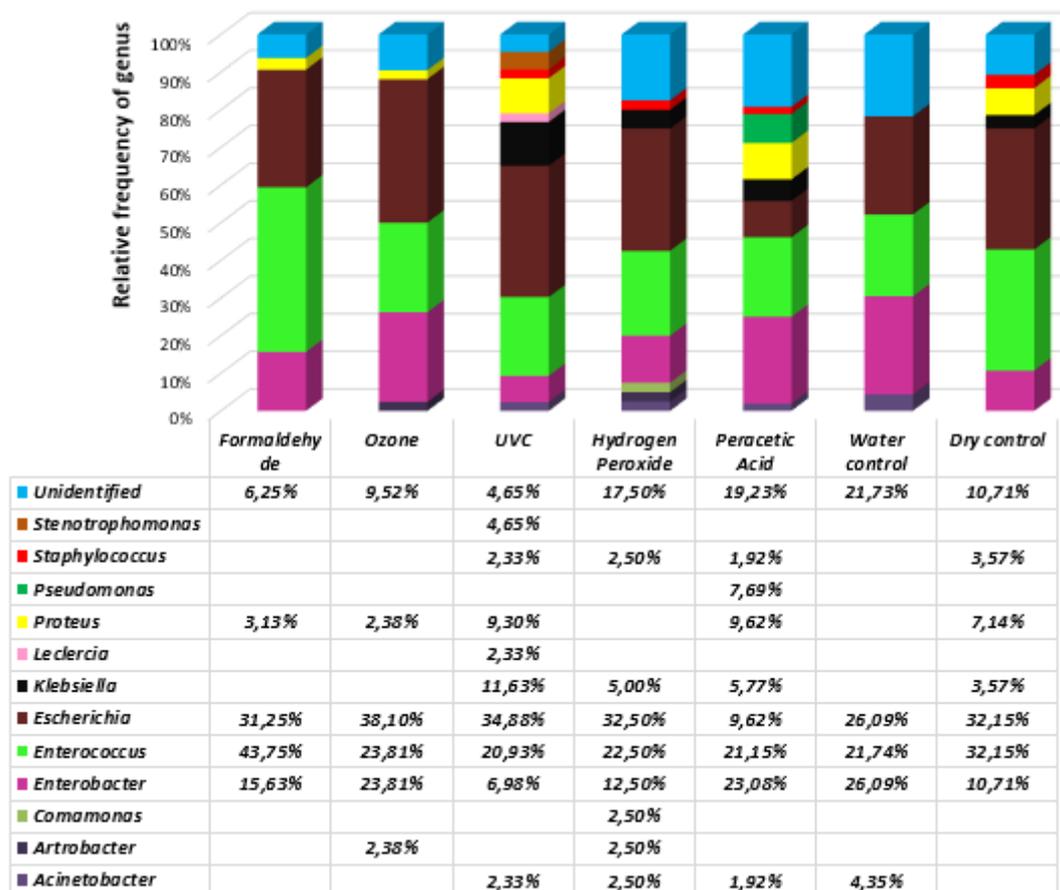


Figure 4. The relative frequency of genera in yolk sac of newly hatched chicks according to the treatments.

MALDI-TOF MS was able to identify bacteria at genus level in 87.3% (227/260) of all isolates. Similar findings were obtained by Karunaratna et al. (2017), who isolated bacteria from unhatched broiler eggs from two commercial hatcheries applying mass spectrometry, and 83.1% of the isolates were identified at genus level. These results demonstrate the potential of MALDI-TOF MS technique to identify bacteria in different circumstances. For bacteria in eggshell surface, this technique was able to identify 63.7% (86/135), probably because the database used includes spectra from relevant bacteria for human and veterinary medicines, leaving aside bacteria

present in the environment. According to Holl et al. (2016), depending on the quality and the quantity of the reference mass spectrometry profiles, the identification of unknown bacteria is not possible and the result occurs as not reliable identification.

Escherichia coli is the most common bacterium isolated from chicks with yolk sac infection and is a major cause of mortality in broilers during the first week (Cortés et al., 2004). Cortés et al. (2004) collected samples for bacterial isolation (liver and yolk sac) from chicks that died during the first week of life. A total of 216 broilers were sampled and 188 *E. coli* strains were obtained in which 39.8% (86) were from the yolk sac. In this study, none of chicks presented clinical signs of yolk sac infection, although, *E. coli* was isolated in higher frequency. For future studies, it is interesting to evaluate mortality on the first week and attempt to correlate it with bacterial isolation.

Karunarathna et al. (2017) demonstrated by MALDI-TOF MS analysis that the majority of nonviable eggs presented contamination by *Enterococcus* species (29.7%), mainly *E. faecalis*, followed by *E. coli* (19.5%). These results are in agreement with the findings of this study in which *Enterococcus faecalis* (57/67; 85.1%) was the main *Enterococcus* species isolated. The others *Enterococcus* species isolated were: *E. gallinarum* (6/67; 8.9%), *E. casseliflavus* (3/67; 4.5%), and *E. avium* (1/67; 1.5%). The dominance of *E. faecalis* in the yolk sac in our study could be explained by the results of Devriese et al. (1991). The small intestine in one-day-old chicks is connected to the yolk sac, so it is expected that the most prevalent bacterium found in small intestine be the same found in the yolk sac. Besides, Devriese et al. (1991) found that the composition of enterococcal intestinal microbiota varied with the age and *E. faecalis* was not isolated in three to four week-old broilers. Although *E. faecalis* constitute the dominating bacterium of the intestinal tract in one-day-old chick, a limited number of types might be associated with extra-intestinal infections, such as: endocarditis

(Chadfield et al., 2004), arthritis (Landman et al., 1999), and pulmonary hypertension syndrome (Tankson et al., 2001). Olsen et al. (2012) investigated the transmission of *E. faecalis* during of hatching of broiler chicks. They found that 15% of *E. faecalis* infection is transmitted vertically and this transmission is five times greater when the parent flocks were older than 42 weeks.

The two *Enterobacter* species isolated from yolk sac were *E. cloacae* (38/44; 86.4%) and *E. asburiae* (6/44; 13.6%). According to Cortés et al. (2004), of all the isolated bacteria from dead pipped eggs only 1% was identified as *Enterobacter*, and even so, it was *E. aerogenes*. Kizerwetter-Świda and Binek (2008) identified bacteria present in yolk sac of chicken embryos and newly hatched chicks. *Enterobacter* was found in embryos at 20 days and in chicks three days after hatching but in low relative frequency, 4% for both. Yet, Eyasu et al. (2017) isolated bacteria from the poultry litter of five farms and *Enterobacter cloacae* was detected in 4% of all collected samples. In this study, the relative frequency of *Enterobacter* among treatments was higher ranging from 6.98 to 26.09%.

In the present study, the most abundant bacteria found in eggshell surface and yolk sac were *Staphylococcus* and *Escherichia coli*, respectively. For future studies, it is important to investigate the efficiency of disinfectants against relevant bacteria for poultry industry in order to determine the best antimicrobial agent in each situation. Besides, it is interesting evaluate the microbiota of the chicks and eggs unhatched to stipulate the ones that are involved with decrease hatchability and chick quality.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the assistance of Pró-Reitoria de Pesquisa at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) for providing funds for publication. We also wish to acknowledge Cobb for its financial support and Rafael Carreon for his technical support. We appreciate the collaboration of the participating industry, and we are thankful to the farm, hatchery managers (Antônio and Clever), and the veterinarian Leonardo Ruiz for dedicating the time and effort to conduct this research. We are grateful to Marcelo Resende, Henrique Figueiredo and Carla Soares for their useful comments and help in laboratory examinations. Finally, the authors thank CAPES for the granted scholarship.

REFERENCES

- Berrang, M. E., N. A. Cox, J. F. Frank, R. J. Buhr, J. S. Bailey, and J. M. Mauldin. 1999. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: A review. *J. Appl. Poul. Res.* 8:499–504.
- Bizzini, A., C. Durussel, J. Bille, G. Greub, and G. Prod'hom. 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 48:1549–1554.
- Braun, P. G., N. Fernandez, and H. Fuhrmann. 2011. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone Sci. Eng.* 33:374–378.
- Board, R.G. and H. S. Tranter. 1995. The microbiology of eggs. Pages 81-104 in *Egg Science and Technology*. W. J. Staldeman and O. J. Cotterill, 4th ed. Binghamton, New York.

- Carbonelle, E., C. Mesquita, E. Bille, N. Day, B. Dauphin, J. Beretti, A. Ferroni, L. Gutmann, and X. Nassif. 2011. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem.* 44:104-109.
- Cadirci, S. 2009. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation—a review. *Arch. Geflügelk* 73:116–123.
- Chadfield, M. S., J. P. Christensen, H. Christensen, and M. Bisgaard. 2004. Characterization of streptococci and enterococci associated with septicaemia in broiler parents with a high prevalence of endocarditis. *Avian Pathol.* 33, 610–617.
- Chavez, C., K. D. Knape, C. D. Coufal, and J. B. Carey. 2002. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.* 81:1132–1135.
- Climaco, W. L. S., E. F. Melo, D. P. Vaz, M. M. Saldanha, M. F. V. S. Pinto, L. C. C. Fernandes, N. C. Baião, L. G. Oliveira, F. M. Sant'anna, M. R. Souza, L. J.C. Lara. 2018. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. *Pesq. agropec. bra.* 53:1177-1183.
- Coufal, C. D., C. Chavez, K. D. Knape and J. B. Carey. 2003. Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. *Poult Sci.* 82:754-759.
- Cortés, C. S., G. T. Isaias, C. L. Cuello, J. M. V. Flores, R. C. Anderson and C. E. Campos. 2004. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. latinoam. microbial.* 46:12-16.
- Cox, N.A., L. J. Richardson, R. J. Buhr, M. T. Musgrove, M. E. Berrang and W. Bright. 2007. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. *J. Appl. Poult. Res.* 16:623-627.
- Devriese, L. A., J. Hommez, R. Wjifels and F. Haesebrouck. 1991. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. *J. Appl. Microbiol.* 71:46-50.

Eyasu, A., F. Moges and A. Alemu. 2017. Bacterial isolates from poultry litters and their antimicrobial susceptibility patterns in Gondar, Northwest Ethiopia. *Int. J. Microbiol. Res. Rev.* 6:197-204.

Fasenko, G. M., E. E. O’Dea Christopher, and L. M. McMullen. 2009. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.* 88:1121–1127.

Gottselig, S. M., S. L. Dunn-Horrocks, K. S. Woodring, C. D. Coufal, and T. Duong. 2016. Advanced oxidation process sanitization of eggshell surfaces. *Poult. Sci.* 95:1356–1362.

Haines, R.B. 1938. Observation on the bacterial flora of the hen's egg with a description of new species of *Proteus* and *Pseudomonas* causing rot in eggs. *J. Hyg. Camb.* 38:338-355.

Holl, L., J. Behr, and R. F. Vogel. 2016. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiol.* 60:84-91.

Karunarathna, R., S. Popowich, M. Wawryk, B. Chow-Lockerbie, K. A. Ahmed, C. Yu, M. Liu, K. Goonewardene, T. Gunawardana, S. Kurukulasuriya, A. Gupta, P. Willson, N. Ambrose, M. Ngeleka, and S. Gomis. 2017. 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 Dis.* 61:472-480.

Keita, A., A. Huneau-Salaün, A. Guillot, P. Galliot, M. Tavares, and J. Puterflam. 2016. A multi-pronged approach to the search for an alternative to formaldehyde as an egg disinfectant without affecting worker health, hatching, or broiler production parameters. *Poult. Sci.* 95:1609–1616.

- Kitis, M. 2004. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. *Environ. Int.* 30:47–55.
- Kizerwetter-Świda, M., and M. Binek. 2008. Bacterial microflora of the chicken embryos and newly hatched chicken. *J. Anim. Feed Sci.* 17:224–232.
- Landman, W. J. M., A. Feberwee, D. R. Mekkes, K. T. Veldman, and D. J. Mevius. 1999. A study on the vertical transmission of arthropathic and amyloidogenic *Enterococcus faecalis*. *Avian Pathol.* 28, 559–566.
- Mayes, F.J. and M. A. Takeballi. 1983. Microbial contamination of hen's egg: a review. *J. Food Prot.* 46:1092-1098.
- Mine, Y., C. Oberle and Z. Kassaify. 2003. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. *J. Agric. Food Chem.* 51:249-253.
- Olsen, R. H., H. Christensen and M. Bisgaard. 2012. Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* during hatch of broiler chicks. *Vet. microbial.* 160:214-221.
- Olsen, R.; E. Kudirkiene, I. Thofner, S. Pors, P. Karlskov-Mortensen, L. Li, S. Pappasolomontos, C. Angastiniotou, and J. Christensen. 2017. Impact of egg disinfection of hatching eggs on the eggshell microbiome and bacterial load. *Poult. Sci.* 96:3901–3911.
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA) Labor. 1991. Occupational exposure to formaldehyde: Response to court remand. 29 CFR 1910.1048. *Fed. Reg.* 56:32302–32318.
- Rai, M. F., S. A. Khan, A. Aslam, and K. Saeed. 2005. Effects of Yolk Sac Infection in Chicken. *Avian Poult. Biol. Rev.* 16:87–93.
- De Reu, K., K. Grijspeerdt, L. Herman, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, J. Debevere, F. Putirulan, and N. M. Bolder. 2006. The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:144–148.

Sander, J. E. and J. L. Wilson. 1999. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. *Avian Dis.* 43:227–233.

Tankson, J.D., J. P. Thaxton, and Y. Vizzier-Thaxton. 2001. Pulmonary hypertension syndrome in broilers caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 69, 6318–6322.

CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desinfecção de ovos férteis de matrizes pesadas com 70 semanas de idade utilizando a luz UV-C e a pulverização com ácido peracético reduz a contagem de micro-organismos aeróbicos totais da superfície da casca do ovo, sem prejudicar a qualidade da casca (espessura e resistência), o rendimento de incubação e a qualidade dos pintinhos de um dia de idade.

É importante ressaltar que os ovos utilizados neste estudo foram ovos limpos, obtidos diretamente do ninho. Por isso, a avaliação desses desinfetantes em ovos sujos nos quais há matéria orgânica e, portanto, maior desafio microbiológico, é fundamental.

A utilização de formaldeído na concentração de 4,63 g/m³ não apresenta resultados satisfatórios na redução da contagem de micro-organismos aeróbicos totais e enterobactérias na superfície da casca do ovo. O ozônio também não apresentou resultado satisfatório, provavelmente porque ainda não se estabeleceram a dose e o tempo de desinfecção ideais, fazendo-se necessária a continuidade dos estudos com este agente.

A pulverização dos ovos com desinfetantes pode danificar a cutícula da casca e com isso prejudicar ou não o rendimento de incubação. Portanto, em estudos futuros, é recomendada a avaliação da cutícula da casca.

A microbiota da casca do ovo é heterogênea com predominância de micro-organismos ambientais, o que justifica o alto número de bactérias não identificadas nesse estudo utilizando a metodologia MALDI-TOF MS, pois essa técnica foi desenvolvida para a identificação rápida de micro-organismos patogênicos e, portanto, há uma carência nos bancos de dados existentes de micro-organismos sem relevância clínica. Os micro-organismos identificados no saco vitelino, em sua maioria, diferem dos encontrados na casca do ovo, o que reforça a importância de se evitar a recontaminação após a desinfecção.

