

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Mestrado Profissional em Produção e Sanidade
Animal



Dissertação

**Influência da densidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos
sanitários de embriões e frangos**

Alethéia Rotta Padilha

Araquari, 2023

Alethéia Rotta Padilha

Influência da densidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos sanitários de embriões e frangos

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Fabiana Moreira

Coorientador (es): Larissa Pickler

Vanessa Peripolli

Teane Milagres Augusto Gomes

Araquari, 2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

P123i Padilha, Alethéia Rotta
Influência da densidade da casca de ovos férteis
sobre o desempenho e aspectos sanitários de embriões
e frangos / Alethéia Rotta Padilha; orientadora
Fabiana Moreira; coorientadora Larissa Pickler;
coorientadora Teane Milagres Augusto Gomes;
coorientadora Vanessa Peripolli. -- on line, 2023.
84 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, , on line, 2023.

Inclui referências.

1. Casca fina. 2. Matrizes pesadas. 3.
Sequenciamento. 4. Ovos de cama. 5. Microbiota. I.
Moreira, Fabiana, II. Pickler, Larissa . III. Gomes,
Teane Milagres Augusto. IV. Peripolli, Vanessa. V.
Instituto Federal Catarinense. . VI. Título.

ALETHÉIA ROTTA PADILHA

**Influência da densidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos
sanitários de embriões e frangos**

Esta Dissertação, foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal) e aprovada em sua forma final pelo curso de Mestrado Profissional em Produção Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, – *Campus Araquari*

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Prof.(ª) Fabiana Moreira

Instituição: Instituto Federal Catarinense – *Campus Araquari*

BANCA EXAMINADORA

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Ricardo Mitsuo Hayashi

Examinador externo à

Instituição

autenticação eletrônica na folha de assinaturas

Ricardo Hummes Rauber

Examinador externo à

Instituição

Araquari

2023

[inserir aqui a folha de autenticação das assinaturas eletrônicas]



DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS Nº 23779/2023 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 16/04/2024 10:59)

FABIANA MOREIRA

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

CGES/ARA (11.01.02.39)

Matricula: ###774#5

(Assinado digitalmente em 15/04/2024 16:16)

IVAN BIANCHI

COORDENADOR DE CURSO - TITULAR

PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

Matricula: ###489#1

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: 23779, ano: 2023, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS**, data de emissão: 15/04/2024 e o código de verificação: **b00bfb1e05**

Agradecimentos

Agradeço a Vida, por me rodear de pessoas de boa índole, com empatia e cheias de vontade de ajudar. Em muitos momentos, essas pessoas me inspiraram e foi com elas que consegui superar as dificuldades e não desistir de alcançar meus objetivos.

Agradeço à instituição IFC Campus Araquari e Concórdia, pela excelência no ensino, aos professores que conheci, pelo profissionalismo e dedicação.

Agradeço à empresa BRF, aos meus supervisores, aos especialistas corporativos e equipe de genética que disponibilizou amparo técnico para concretizar esse estudo.

As equipes das granjas de matrizes, do incubatório de HDO e do CTA, por todo compromisso e agilidade com esse estudo. Denize Maciel e José Borges, minha gratidão por toda responsabilidade que vocês tiveram comigo.

Ao laboratório DSM pela colaboração financeira, por compartilhar conhecimentos e pela análise dos dados para obtenção do estudo.

Aos amigos pela compreensão nos vários momentos de ausência.

Agradeço imensamente as minhas coorientadoras, Teane Gomes por ser minha primeira incentivadora; Vanessa Peripolli por ser fonte de alegria e otimismo; Larissa Pickler por dar todo o auxílio necessário para a elaboração e conclusão do estudo.

A minha orientadora, Fabiana Moreira, por todo conhecimento e paciência. Por compreender minhas limitações e me direcionar a concretização do meu sonho.

Aos meus pais, José Padilha (*in memoriam*) e Silvia Helena, obrigada pela vida, pelo amor e por me ensinarem desde sempre, a buscar meus objetivos e sonhos.

Ao meu maravilhoso esposo, João Henrique Bagetti, por ser meu grande amor, por incentivar a decisão de iniciar esse projeto de vida, o qual você participou, amenizando com carinho toda a minha ausência.

Ao meu maior amor, meus filhos José Henrique e Maria Helena, por ser preciso cancelarmos idas ao parque. Eu amo vocês e em algum momento, essa etapa de nossas vidas, será lembrada com muita mais alegria. Também foi por vocês que não desisti.

Resumo

PADILHA, Alethéia Rotta. **Influência da densidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos sanitários de embriões e frangos.** 2023. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2023.

São inúmeros e constantes os desafios do segmento de produção de ovos férteis, para alavancar resultados, dessa forma faz-se necessário a análise de desempenho do incubatório e do frango e análise da composição da microbiota intestinal dos pintos de um dia, a fim de direcionar para melhores decisões. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da qualidade da casca de ovos férteis em parâmetros produtivos no incubatório, no frango e na microbiota intestinal de pintos de um dia. Foram realizados dois experimentos, para o experimento I foram utilizados ovos férteis de duas granjas, uma positiva para BIG (Bronquite Infecciosa das Galinhas) e a outra negativa. Da granja positiva (BIG positiva) e a negativa (BIG negativa), foram utilizados 5.848 ovos, divididos em 4 tratamentos: T1 - ovos de casca normal, BIG negativa; T2 - ovos de casca fina, BIG negativa; T3 - ovos de casca normal, BIG positiva e T4 - ovos de casca fina, BIG positiva. No incubatório foram avaliados índices zootécnicos, embriões não eclodidos e embriodiagnóstico. Foram alojados 1.742 pintos, sendo 448 pintos/tratamento, divididos em 8 repetições e foi avaliado o desempenho dos frangos de 1 a 42 dias de idade. Para o experimento II, foram utilizados 13.760 ovos férteis, divididos em 4 tratamentos: T1 - ovos de casca normal de ninho; T2 - ovos de casca normal de cama; T3 – ovos de casca fina de ninho; T4 – ovos de casca fina de cama. Para avaliação da composição da microbiota intestinal, foram amostrados 800 pintos/divididos em 10 repetições, e avaliada a composição da microbiota. Os dados zootécnicos e sanitários dos experimentos foram submetidos a análise de Shapiro Wilk e teste de Tukey. Os dados do experimento II foram submetidos a análise de *two-way* ANOVA. No experimento I ovos de casca normal, apresentaram maior porcentagem de eclosão e eclodibilidade, menor porcentagem de pintos descartados, maior mortalidade inicial e intermediária, contaminações bacterianas e fúngicas ($P<0,05$) comparados aos ovos de casca fina. Ovos de matrizes positivas para BIG apresentaram redução da porcentagem de eclosão, eclodibilidade ($P<0,05$), maiores porcentagens de pintos descartados, contaminações bacterianas e fúngicas, e mortalidade final ($P<0,05$). No experimento II, foi observado que ovos de casca fina de cama, foi pior em relação aos ovos de casca fina de ninho ($P<0,05$) nos parâmetros; pintos descarte, mortalidade inicial, intermediária e final, contaminação bacteriana e fúngica, bicado vivo e morto. Na avaliação da composição da microbiota não houve diferença nos tratamentos. Conclui-se que a densidade da casca, presença de BIG, local de postura, impacta os índices zootécnicos de incubação, desempenho do frango, sem impactar na composição da microbiota intestinal.

Palavras chaves: Casca fina; matrizes pesadas; sequenciamento; ovos de cama; microbiota.

Abstract

PADILHA, Alethéia Rotta. **Influence of fertile eggshell density on the performance and health aspects of embryos and chickens.** 2023. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2023.

There are countless and constant challenges in the fertile egg production segment, to leverage results, therefore it is necessary to analyze the performance of the hatchery and the chicken and analyze the composition of the intestinal microbiota of day-old chicks, in order to direct for better decisions. The objective of the study was to evaluate the influence of fertile eggshell quality on production parameters in the hatchery, in the chicken and on the intestinal microbiota of day-old chicks. Two experiments were carried out, for experiment I fertile eggs from two farms were used, one positive for BIG (Avian Infectious Bronchitis) and the other negative. From the positive (BIG positive) and negative (BIG negative) farms, 5.848 eggs were used, divided into 4 treatments: T1 - eggs with normal shells, BIG negative; T2 - thin-shelled eggs, BIG negative; T3 - eggs with normal shells, BIG positive and T4 - eggs with thin shells, BIG positive. In the hatchery, zootechnical indices were evaluated, unhatched embryos and embryodiagnosis. 1.742 chicks were housed, 448 chicks/treatment, divided into 8 replications efhi evaluated the performance of chickens from 1 to 42 days of age. For experiment II, 13.760 fertile eggs were used, divided into 4 treatments: T1 - eggs with normal nest shells; T2 - eggs with normal shells; T3 – thin-shelled nest eggs; T4 – thin-shelled eggs. To evaluate the composition of the intestinal microbiota, 800 chicks were sampled/divided into 10 replications, and the composition of the microbiota was evaluated. The zootechnical and sanitary data from the experiments were subjected to analysis by Shapiro Wilk and Tukey test. Data from experiment II were subjected to two-way ANOVA analysis. In experiment I eggs with normal shells, presented a higher percentage of hatchability and hatchability, lower percentage of discarded chicks, higher initial and intermediate mortality, bacterial and fungal contaminations ($P < 0.05$) compared to eggs with thin shells. Eggs from BIG-positive breeders showed reduced hatching percentage, hatchability ($P < 0.05$), higher percentages of discarded chicks, bacterial and fungal contamination, and final mortality ($P < 0.05$). In experiment II, it was observed that thin-shelled litter eggs were worse compared to thin-shelled nest eggs ($P < 0.05$) in the parameters; discarded chicks, initial, intermediate and final mortality, bacterial and fungal contamination, live and dead pecking. When evaluating the composition of the microbiota, there was no difference in the treatments. It is concluded that shell density, presence of BIG, laying location, impacts zootechnical incubation indexes and chicken performance, without impacting the composition of the intestinal microbiota.

Keywords: Thin shell; heavy dies; sequencing; bed eggs; intestinal microbiota.

Lista de Figuras

Figura 1	Componentes da casca do ovo.....	12
Figura 2	Categorias de ovos férteis selecionados para incubação. (a) Ovos Não Incubáveis, destacando ovo casca fina em vermelho; (b) Ovos	33
Figura 3	Incubáveis.....	
	Resultados da titulação para BIG negativa e positiva das	41
Figura 4	matrizes.....	61
Figura 5	Coleta de conteúdo intestinal de pintos.....	62
Figura 6	Fluxograma da análise de sequenciamento de microbiota.....	
	Principais gêneros isolados no conteúdo intestinal dos pintos em cada tratamento.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1	Programa de luz e temperatura dos aviários conforme a idade dos frangos.....	30
Tabela 2	Tratamentos do estudo de acordo com a densidade da casca dos ovos e diagnóstico para o vírus de BIG.....	31
Tabela 3	Classificação de mortalidade embrionária por fase de acordo com o exame de embriodiagnóstico.....	37
Tabela 4	Valores nutricionais da ração.....	38
Tabela 5	Efeito da densidade da casca do ovo e a positividade das matrizes para BIG sobre os parâmetros zootécnicos de incubatório.....	42
Tabela 6	Efeito da densidade da casca do ovo e do vírus de BIG sobre os parâmetros de desempenho de frangos.....	44
Tabela 7	Tratamentos do estudo de acordo com a densidade da casca e local de coleta dos ovos.....	55
Tabela 8	Tratamentos de acordo com local de coleta, densidade da casca dos ovos e número de pintos amostrados.....	56
Tabela 9	Classificação de mortalidade embrionária por fase de acordo com o exame de embriodiagnóstico.....	59
Tabela 10	Efeito da densidade da casca do ovo e o local de postura dos ovos, sobre os parâmetros zootécnicos de incubatório.....	65

Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
%	Porcento
Kg	Quilograma
pH	Potencial hidrogeniônico
p.p.m.	Parte por milhão
vol.	Volume
°C	Graus Celsius
M	Metro
ml	Mililitros
G	Gramas
UR	Umidade relativa

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	11
1.1	Produção de ovos férteis no Brasil.....	11
1.2	Sistema reprodutivo e a formação da casca do ovo.....	11
1.3	Componentes da casca do ovo.....	12
1.4	Qualidade da casca do ovo.....	13
1.5	Fatores relacionados a qualidade da casca do ovo.....	14
1.6	Gravidade específica da casca do ovo.....	17
1.7	Desempenho dos frangos relacionado a qualidade dos ovos.....	18
1.8	Desenvolvimento da microbiota intestinal das aves.....	19
1.9	Composição da microbiota intestinal das aves e a função das bactérias.....	20
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Geral.....	266
2.2	Específicos.....	266
3	Influência da qualidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos sanitários de embriões e frangos.....	277
3.1	Introdução.....	27
3.2	Material e Métodos.....	28
3.2.1	Comitê de Ética.....	28
3.2.2	Local e animais.....	28

3.2.3	Análise estatística.	39
3.3	Resultados.....	40
3.4	Discussão.....	45
3.5	Conclusão.....	48
4	REFERÊNCIAS.....	49
5	Influência da densidade e qualidade da casca dos ovos férteis em parâmetros produtivos no incubatório e na microbiota intestinal de pintos de um dia.	52
5.1	Introdução.....	52
5.2	Material e Métodos.....	54
5.2.1	Comitê de Ética.....	54
5.2.2	Local e animais.....	54
5.2.3	Análise estatística.	63
5.3	Resultados.....	63
5.4	Discussão.....	67
5.5	Conclusão.....	71
6	REFERÊNCIAS.....	72
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

8	REFERÊNCIAS.....	77
---	------------------	----

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

1.1 Produção de ovos férteis no Brasil

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), no ano de 2022 o Brasil alojou mais de 56 milhões de matrizes pesadas de frango, 1% a mais comparado ao ano anterior. Produziu mais de 14 milhões de toneladas de carne de frango, sendo 66,8% do volume total destinados ao mercado interno e o restante à exportação (ABPA, 2022).

No setor de produção de ovos incubáveis, é de fundamental importância para o desempenho econômico da atividade uma casca de boa qualidade, para o desenvolvimento adequado do embrião e manutenção dos índices de eclodibilidade (Gutiérrez et al., 2021).

1.2 Sistema reprodutivo e a formação da casca do ovo

O sistema reprodutivo das galinhas inclui os órgãos; ovário, oviduto, vagina e cloaca. A cloaca sendo considerado, órgão comum ao aparelho digestório. O oviduto é constituído pelos órgãos; infundíbulo, magno, istmo, útero (Gouveia et al., 2023).

O infundíbulo é o local encarregado de receber o oócito produzido pelo ovário, ocorrendo a fecundação, formação da chalaza e armazenamento de espermatozoides. O magno é responsável pela produção do albúmen, o istmo pelas membranas da casca. A casca é produzida no útero, que pigmenta a casca e produz a cutícula. Assim que o ovo é formado, passa pelo canal vaginal, para chegar na cloaca, a cada 25 horas (Silva E., 2020).

A formação da casca do ovo ocorre no útero ou glândula da casca das galinhas, por um período de 18 horas, recebendo fluido, que contém todos os minerais e componentes orgânicos necessários à formação do ovo. A quantidade de casca depositada depende do tempo de permanência do ovo no útero, portanto, quanto maior o intervalo entre a postura dos ovos, maior será a quantidade de casca depositada (Qingyong et al., 2021).

A casca do ovo possui seis camadas, sendo que a região mamilar desempenha um papel importante na qualidade do ovo. O albúmen possui função de absorção de impactos,

sendo uma camada que circunda a gema, uma camada média e uma camada próxima a casca (Padilha; Madureira, 2023).

A casca do ovo forma uma câmara embrionária para o pintinho em desenvolvimento, fornecendo proteção mecânica e meio de troca gasosa controlada (Attard; Portugal, 2021).

A casca apresenta pequenos poros para troca de gases e proteção contra danos físicos e contaminantes (Silva, W. et al., 2020). Os poros são cavidades em forma de funis, amplos na superfície da casca e que se estreitam, formando canais (Hutton, 2005).

1.3 Componentes da casca do ovo

A casca do ovo é constituída pelas membranas interna e externa, camada mamilar, camada paliçada, camada de cristal vertical, cutícula e os poros, como mostra a Figura 1. A casca do ovo é composta quimicamente por 94% de carbonato de cálcio, 1% de fosfato de cálcio, 1% de carbonato de magnésio e 4% de matéria orgânica e água, ou seja, a casca do ovo é formada essencialmente por cálcio (Vieira et al., 2017).

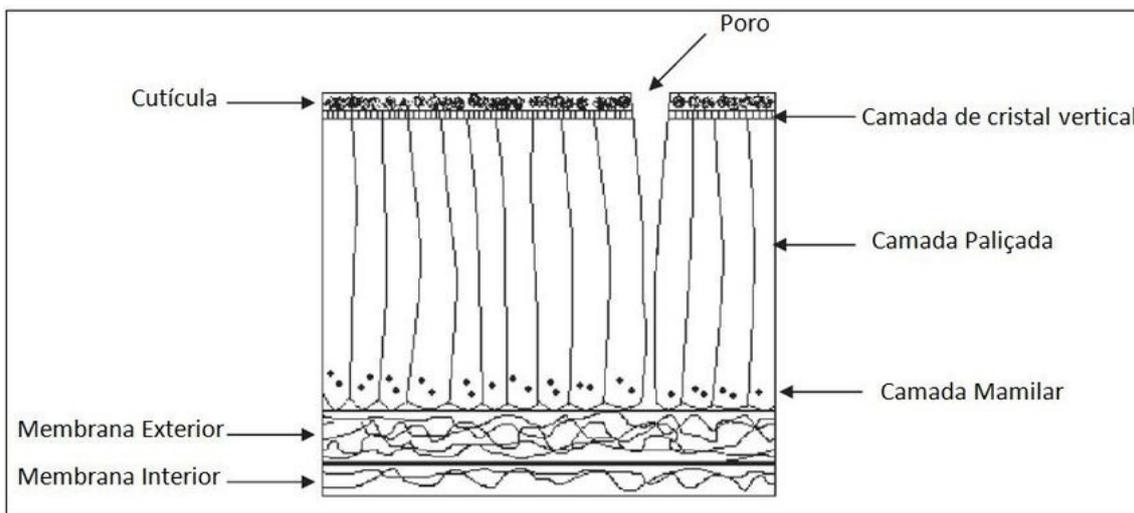


Figura 1. Componentes da casca do ovo.

Fonte: Vieira et al., 2017.

As membranas são importantes para a formação da casca dos ovos, possuem a função de sustentar a camada mamilar, que é composta por pequenas massas de material orgânico, ligadas à superfície externa da membrana externa. A membrana interna é mais irregular que a externa e possui bases para a camada mamilar. Algumas de suas fibras chegam a entrar na camada calcificada da casca. O processo de cristalização e subsequente formação da casca dos ovos inicia por essas estruturas (Ito, 1998).

A estrutura da casca é perfeitamente ordenada, dividida em camadas, e resulta de uma deposição sequencial de fração orgânica, 3,5%, e mineral, 96,5%, que ocorre nos segmentos istmo e útero da galinha, durante um período predeterminado. A porção orgânica da casca consiste nas membranas da casca, nos sítios mamilares de nucleação e na cutícula. A fração calcificada é composta pela camada mamilar, camada esponjosa e camada de cristal vertical (Parsons, 1982).

1.4 Qualidade da casca do ovo

As características que definem a qualidade dos ovos são divididas em características de qualidade externa e interna. As características de qualidade externa incluem o tamanho, forma, limpeza, cor, integridade da casca e ausência de má formação de casca (Matias, 2020).

A qualidade interna refere-se às características de albúmen, gema e presença de manchas de sangue ou fragmentos da mucosa do oviduto no interior do ovo (Benavides-Reyes, 2021). Sabe-se que o tamanho e o peso do ovo aumentam com a idade, mas o peso da casca não aumenta na mesma proporção, como consequência, à medida que a ave envelhece, a estrutura da casca sofre modificações que demonstram queda na sua qualidade (Benavides-Reyes, 2021).

Outro fator que apresenta papel essencial na determinação da qualidade da casca é o tempo de oviposição, já que a quantidade de casca depositada tem relação direta com o tempo de permanência no interior do útero, influenciando, portanto, na espessura (Tumová;

Ebeid, 2005). Os ovos de casca fina apresentam a casca calcária mais enfraquecida devido ao pouco tempo que permanece no interior do útero da galinha (Zhang et al., 2019).

A densidade da casca dos ovos está diretamente relacionada à sua resistência, no entanto ovos com maior percentual de casca ou espessura não obrigatoriamente demonstram maior resistência frente a agressões mecânicas sujeitos na coleta, processamento e distribuição, uma vez que a resistência está relacionada tanto com a espessura, quanto com a distribuição do material na casca, o tamanho e o formato do ovo (Badeca et al., 2020).

O prejuízo dos produtores em relação à perda de ovos, está intimamente relacionado com a qualidade da casca dos ovos, visto que há grande dificuldade e diversidade de medidas para avaliar essas características (Badeca et al., 2020).

1.5 Fatores relacionados a qualidade da casca do ovo

Entre os fatores que interferem na qualidade da casca dos ovos, pode-se destacar a contaminação pelo vírus de BIG (Santos, et al., 2005); a nutrição (Korver, 2020); os ovos postos em cama, e a idade da ave (Benavides-Reyes et al., 2021).

1.5.1 Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG)

Em se tratando de sanidade de aves e qualidade da casca, uma das enfermidades com grande interferência na qualidade da casca dos ovos é a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) (Santos, et al., 2005).

O vírus de BIG pertence à família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales*. Dentro da subfamília *Coronavirinae*, há quatro gêneros, sendo o gammacoronavírus o único associado a doença das aves (Sharma et al., 2020).

O vírus de BIG causa uma patologia viral aguda e altamente contagiosa que provoca grandes perdas econômicas à indústria avícola em todo o mundo (Huiyan et al., 2021). Quando a infecção pelo vírus de BIG ocorre durante a postura, pode haver alteração da qualidade interna e da casca do ovo (Quinteros et al., 2022). A redução da produção de ovos

e comprometimento da qualidade interna e externa dos ovos, é realizada devido ao acometimento e lesões das células do oviduto (Santos, et al., 2005).

Os sinais clínicos do vírus de BIG em reprodutoras mais comum é queda de produção acompanhada de ovos de casca fina, albumina liquefeita, ovos mais claros e deformados devido a infecção atingir também o trato reprodutivo, causando permanentes danos ao oviduto e ao útero da matriz, afetando a qualidade da casca de ovos férteis e consequentemente a eclodibilidade. Em machos acometidos ocorre queda de fertilidade (Bisgaard, 1976; Di Fábio, 2009; Back, 2010).

Apesar de apresentar sinais cursando com problemas respiratórios, a bronquite também atinge o sistema reprodutivo das aves, ocorrendo queda variável da produção e perda de qualidade da casca, chegando até a deformações (Ramakrishnan; Kappala, 2019).

A transmissão ocorre pela via horizontal, e não há evidências de transmissão vertical contudo pode haver contaminação do ovo pela casca devido a carga viral ambiental (Ramakrishnan; Kappala, 2019).

É observado baixo ganho de peso, baixa conversão alimentar em frangos infectados pelo vírus de BIG. Em matrizes pesadas, a infecção diminui a produção de ovos e a qualidade de casca dos ovos, podendo afetar a eclodibilidade de ovos embrionados (Santos K., 2022).

Através de análise dos sinais clínicos e provas laboratoriais realiza-se o diagnóstico. O isolamento viral pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR) é utilizado como método de diagnóstico. Para aves vacinadas, quando o resultado for positivo se faz necessário o diagnóstico de sequenciamento viral, verificando o tipo de cepa encontrada (vacinal ou cepa de campo) juntamente com a verificação do aumento de título de anticorpos circulantes que é executada através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), que utiliza de uma prova sorológica qualitativa (Santos K., 2022).

Uma grande variedade de técnicas está disponível para detectar o vírus de BIG, contudo, é comum incluir o isolamento e a caracterização molecular. O teste RT-PCR é o método de diagnóstico mais utilizado para detectar diretamente o vírus de BIG a partir de amostras biológicas (Pereira et al., 2018).

O diagnóstico do vírus de BIG necessita de alguns testes laboratoriais que se complementam, a preferência se dá para o isolamento e a identificação viral, sempre em conjunto com a sorologia (Santos, K., 2022).

1.5.2 Nutrição

A qualidade da casca está diretamente relacionada com a nutrição das aves, por isso essa é de extrema importância. O cálcio e o fósforo são os nutrientes que mais influenciam na qualidade da casca, porém os níveis de vitamina D3 e a água também tem participação importante na casca dos ovos (Gherardi; Vieira, 2018).

O cálcio é o mineral de maior importância para a casca dos ovos, porém quando esse mineral estiver em excesso, interfere no metabolismo do fósforo, zinco, manganês. Para se obter uma melhor qualidade de casca se faz necessário que os níveis de cálcio e fósforo estejam de acordo com a idade e o consumo da galinha (Jardim et al., 2005). O fósforo e o cálcio além de grande importância na produção, podem ser considerados reguladores de ingestão de alimentos (Jardim et al., 2005).

O desempenho das aves está diretamente relacionado com a qualidade da casca dos ovos), influenciando na taxa de postura, peso dos ovos, conversão alimentar e ganho de peso. Na produção do ovo ocorre uma perda especialmente grande de cálcio (Carvalho, 2012).

1.5.3 Ovos postos na cama

Ovos de cama, são aqueles que são postos fora do ninho pelas matrizes pesadas. A presença desse tipo de ovo é considerada multifatorial (Van Den Oever et al., 2020). Um dos grandes problemas enfrentados na incubação é o aproveitamento dos ovos de cama, por aumentarem o número de ovos com risco sanitário na incubação. A contaminação bacteriana e fúngica interna dos ovos de cama é maior que a de ovos de ninho, o que pode interferir na eclodibilidade e na composição da microbiota do pintinho (Costa, 2021).

A qualidade física dos pintos oriundos de ovos de cama é inferior ao comparar com pintos oriundos de ovos de ninho, entretanto não há efeito sobre o ganho de peso durante a criação (Van Den Brand et al., 2016).

1.5.4 Idade da matriz

As galinhas ao ficarem mais velhas, produzem ovos com qualidade de casca inferior, com quantidade de albúmen diminuída e com maior peso e porcentagem de gema (Garcia et al., 2010). As ovulações com o passar da idade, passam a serem mais espaçadas, resultando em um ovo de maior tamanho e gema em maior quantidade (Padilha; Madureira, 2023).

As matrizes mais velhas produzem ovos de qualidade inferior as matrizes mais novas, as membranas da casca nos ovos de matrizes novas são mais espessas (Schadeck, 2020).

A idade das aves influencia a densidade da casca dos ovos e é evidenciada por afetar a qualidade interna e externa do ovo, peso do ovo e a qualidade do pinto (Francisco, 2011).

Com o passar da idade das matrizes, há redução da eclodibilidade dos ovos, isso pode ocorrer devido aos embriões nos ovos maiores e pesados terem mais dificuldade para perder calor ao final da incubação (Rosa et al., 2002).

1.6 Gravidade específica da casca do ovo

Há métodos diretos e indiretos para avaliar a qualidade da casca, os métodos diretos embora mais fáceis e rápidos, necessita da ruptura da casca e perda das substâncias internas. O método indireto é mais utilizado nas indústrias, pois não se faz necessário à quebra do ovo, é o método de análise de gravidade específica (Reis et al., 2021).

A avaliação de gravidade específica (GE) é importante para determinar a densidade do ovo, pois gera uma resposta direta em relação à densidade da casca. Aves que apresentam idade entre 35 e 55 semanas produzem ovos com maior GE, apresentando maiores taxas de eclosão, já aves com idade superior a 56 semanas, produzem ovos com cascas de menor espessura, conferindo assim uma menor GE dos seus ovos (Rosa; Ávila, 2000).

A avaliação de GE dos ovos consiste em preparar quatro baldes com solução de água e sal, (solução salina) com as densidades de cada balde identificadas em densidade da solução salina de 1,060 a 1,075, aumentando em cada balde 0,005 de densidade da solução, adicionado sal para conseguir esse aumento na densidade. Os ovos que flutuarem conferem a densidade específica identificada no balde. Os ovos que afundarem, devem ser mergulhados na solução seguinte com densidade de 1,065, e assim sucessivamente até o balde de solução a 1,075. A GE ou densidade da casca será igual à solução em que o ovo flutuar, portanto, quanto maior a (GE), maior a densidade da casca (Reis et al., 2021).

Os ovos com cascas com densidades 1,080 são os que apresentam os melhores resultados, uma vez que ovos contendo densidades \leq a 1,075 terão casca mais fina, e, portanto, maior perda de umidade e eclosão (Arslan; Yamak, 2020).

1.7 Desempenho dos frangos relacionado a qualidade dos ovos

O desempenho dos lotes de frango também é influenciado pela qualidade dos pintos de um dia, estando diretamente associado a qualidade dos ovos. Os ovos férteis postos na cama estão propensos a serem penetrados por microrganismos que contaminam vários embriões e outros ovos e pintos durante o processo de incubação, influenciando negativamente na eclodibilidade e promovendo nascimento de pintos de baixa qualidade (Berrang et al., 1999).

O sucesso para pintinhos de qualidade depende, em primeiro lugar, da qualidade dos ovos férteis, fornecidos pelas granjas de matrizes, que devem garantir a qualidade física e química dos ovos a serem incubados. A prática de manejo como seleção, classificação e desinfecção de ovos deve ser realizada, pois estes métodos melhoram os índices de eclosão e o desempenho pós-nascimento (Melo, 2019).

A qualidade do pintinho está relacionada com as características do ovo incubado, portanto é fundamental a manutenção das propriedades reprodutivas das matrizes pesadas para a produção viável de pintinhos com alta qualidade (Rosa; Ávila, 2020).

A qualidade da casca dos ovos influencia o desenvolvimento embrionário e o desempenho final dos frangos, pois depende de um bom desenvolvimento embrionário para maximizar o crescimento pós-nascimento (Hulet, 2007).

1.8 Desenvolvimento da microbiota intestinal das aves

A microbiota intestinal é formada por um conjunto de microrganismos comensais do trato intestinal, quando ocorre harmonia entre os microrganismos com seu hospedeiro, e que promovem a renovação epitelial, defesa contra os patógenos oportunistas, além de realizar a manutenção da motilidade intestinal e absorção de nutrientes fornecido pelo hospedeiro (Kogut, 2019).

A multiplicação de diversos agentes benéficos, o auxílio na digestão e a sinergia com o sistema imunológico para limitar multiplicação de bactérias patogênicas são funções da microbiota intestinal (Sender et al., 2016).

Logo após o nascimento do pinto inicia-se a colonização pela microbiota intestinal por microrganismos oriundos da casca do ovo, do ambiente, de alimento e água, exigindo do organismo da ave tolerância entre bactérias benéficas e bactérias nocivas, a fim de manter a saúde do animal em eubiose (Oliveira, 2022). Além do mais, pintos de ovos de incubação artificial demandam maior tempo para o desenvolvimento de sua própria microbiota, diferente de pintinhos oriundos de eclosão natural, onde herdam a microbiota da sua mãe (Shehata et al., 2021).

No início de vida da ave o desenvolvimento da microbiota intestinal é crucial, para melhorar desempenho e conversão alimentar (Rychlik, 2020). Estudos demonstram a importância da microbiota intestinal, principalmente a microbiota cecal, para que ocorra melhor digestão, absorção dos nutrientes e consequentemente o desempenho dos frangos (Stanley et al., 2014; Yan et al., 2017).

Com o avanço da tecnologia de sequenciamento do gene ribossômico do RNA (rRNA) 16S bacteriano, é possível se obter uma maior precisão na identificação e enumeração de

bactérias intestinais das aves, bem como avanços na compreensão do equilíbrio e o papel do microbioma na saúde e na produtividade animal (Shabbir et al., 2018).

Está sendo amplamente utilizada na produção avícola, o sequenciamento de última geração, como o NGS (Next-generation sequencing). Entretanto, está mais relacionado ao estudo da microbiota intestinal e respiratória (Shabbir et al., 2018; Shaufi et al., 2015).

Para se conhecer um ecossistema é preciso primeiro caracterizá-lo, para posteriormente entender seu papel e função. É imprescindível entender as relações entre microbiota e hospedeiro, para conhecer a origem e mecanismo de infecções oportunistas e a propagação de organismos resistentes a antibióticos (Oviedo-Rondon, 2009).

1.9 Composição da microbiota intestinal das aves e a função das bactérias

A colonização do trato gastrointestinal (TGI) pode ocorrer antes ou após a eclosão dos ovos, dependendo de alguns fatores, como o manejo sanitário, higienização do incubatório e saúde das matrizes. Em relação a saúde das matrizes, as aves podem entrar em contato com cepas bacterianas desde o desenvolvimento embrionário, contaminando o ovo antes da oviposição por transmissão vertical ou após, por transmissão horizontal (Macari et al., 2014).

A transmissão vertical ocorre devido a presença de bactérias que sobrevivem tanto no ambiente da cloaca quanto do sêmen, que conseguem atingir níveis sistêmicos, podendo alojar-se em órgãos como o ovário e oviduto, levando inclusive a carga bacteriana para o interior dos ovos. A microbiota intestinal dos pintos nascidos naturalmente é proveniente principalmente da mãe. Uma vez estabilizada, forma um sistema responsável por influenciar fatores microbiológicos, fisiológicos e bioquímicos no hospedeiro (Figueira et al., 2014).

A avicultura industrial alterou essa condição, de modo que, as aves nascem em incubatórios, o que dificulta o acesso precoce do neonato aos microrganismos colonizadores, retardando o desenvolvimento da microbiota (Demattê; Pereira, 2018).

O TGI do embrião pode ser colonizado por via vertical, onde os microrganismos presentes no aparelho reprodutor da mãe são transferidos para o embrião durante a

formação do ovo. Também pode ocorrer ao ingerir o conteúdo do fluido amniótico a partir do 14 dia de incubação (Pedroso, 2011).

O pinto ao nascer, o TGI é praticamente isento de microrganismos e a microbiota é formada por meio de ingestão, ou contato com ambiente. O intestino delgado é colonizado na segunda semana de vida (Maiorka, et al., 2006).

A ave possui a microbiota intestinal composta por uma diversidade de microrganismos, quando vivem em simbiose com o hospedeiro, desempenham importante função realizando renovação de enterócitos, defesa contra os patógenos oportunistas e melhorando o aproveitamento de nutrientes (Kogut, 2019).

O bom desempenho zootécnico dos frangos está relacionado com a saúde intestinal ótima das aves, ou seja, com uma microbiota intestinal em equilíbrio, dessa forma, mesmo que as aves recebam rações de boa qualidade e ambientes adequados, sem a saúde intestinal, não haverá elevada produção (Oliveira et al. 2017).

A microbiota intestinal das aves possui inúmeras espécies de bactérias, 2.800 espécies já foram identificadas. Aproximadamente 90% das bactérias que compõem o trato gastrointestinal (TGI) das aves são bactérias benéficas, pertencentes aos filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria* e *Bacteriodetes*. As bactérias patogênicas completam os 10%, pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Protozoa*, *Apicomplexa*, *Tenericutes* e *Firmicutes* (Gedek, 1986; Cruz et al., 2022).

Entre os diversos gêneros, são considerados benéficos os *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Fusobacterium spp.* e *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto os gêneros patogênicos, são *Escherichia coli*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.* e *Campylobacter sp.* (Oliveira, 2022).

Clostridium sp

Pertencente ao Filo *Firmucutes*, as principais bactérias do gênero *Clostridium sp* (*C. sp*) são Gram-positiva, anaeróbias e produtoras de toxinas. As espécies do *C. sp* produzem

toxinas, causando lesões em bactérias benéficas levando a morte celular, consequentemente se proliferam, causando um processo infeccioso (Albornoz et al., 2014).

Encontradas no intestino delgado e ceco das aves, são formadoras de esporos resistentes ao meio ambiente e produzem toxinas causadoras de doenças, acometem jejuno e íleo, causando hemorragia severa. Espécies relevantes para as aves são *C. colinum* causadora de enterite ulcerativa e *C. perfringens*, causadora de enterite necrótica (Albornoz et al., 2014).

O *Clostridium saudienses* anteriormente conhecido como *C. saudii*, é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica e formadora de esporos. A bactéria foi posteriormente renomeada de *Clostridium saudiense*, identificada pela primeira vez em fezes de um homem obeso, saudita com 24 anos (Angelakis et al., 2014).

Enterococcus sp

Pertencente ao Filo *Firmicutes*, os *Enterococcus (E.) spp* são bactérias Gram-positiva, ovoides, não formadoras de esporos, habitam o intestino de animais vertebrados e invertebrados. São bactérias anaeróbicas, possuem mais 50 cepas e são isoladas do solo, da superfície da água (Jung et al., 2018).

Os *Enterococos* possuem capacidade de crescer em 10°C e 45°C, para iniciar o crescimento em 6,5% Caldo NaCl em pH 9,6 e para sobreviver a 60°C por 30 min, são características comumente usadas para segregar enterococos de outros estreptococos (Martinez et al., 2003).

Os *E. faecium* são bactérias comensais do TGI, porém possuem capacidade patogênica, encontrada em grande quantidade na microbiota intestinal de pintinhos de um dia de idade, causando onfalite (Devriese et al., 1991).

A microbiota benéfica é essencial no desenvolvimento e saúde da ave, o *E. faecium*, possui efeitos probióticos, aumenta a altura dos vilos no íleo e diminui a multiplicação da salmonela devido a produção de bacteriocina (Kraimi et al., 2018); (Borda-Molina et al.,

2020). São encontrados em habitats diversos como o trato gastrointestinal, cavidade oral e trato genital superior do homem e outros mamíferos, e em aves (Morrison, 1997).

O *E. faecalis*, anteriormente conhecido como *Streptococcus faecalis*, considerado comensal no intestino da maioria dos mamíferos, aves, répteis (Lebreton et al., 2014). Nas aves é um patógeno oportunista, as cepas de *E. faecalis* apresentam variações na virulência e na letalidade de embriões de matrizes (Blanco et al., 2018).

Quando encontrado no intestino tem função simbiótica, porém com o uso irresponsável de antibióticos, ocorreram muitas mutações em bactérias benéficas e simbióticas nos intestinos das aves (Gilmore, 2013).

O *E. cecorum* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbica, encontrada no intestino das galinhas, conhecida por causar paralisia, claudicação e mortalidade levando a altas taxas de condenação e grandes perdas econômicas devido a septicemia causada por essa bactéria (Jung et al., 2018).

Evidências recentes sugerem que o *E. cecorum* patogênico está emergindo como um desafio grave na produção avícola, causando perdas significativas aos plantéis comerciais com envolvimento de doenças locomotoras em frangos (Aitchison et al., 2014).

Escherichia coli

Pertencente ao Filo *Proteobacteria*, a *Escherichia coli* é uma bactéria comensal do TGI das aves, Gram-negativa, uma das principais bactérias patogênicas e oportunista para as aves, causando muitas patologias em animais imunossuprimidos. Encontrado nos primeiros dias de vida das aves no intestino delgado e no ceco (Tanikawa et al., 2011).

As cepas comensais não são patogênicas, inclusive competem por locais de aderência com outras Enterobactérias mais agressivas, como a *Salmonella*. As cepas patogênicas apresentam fatores de virulência diferentes das comensais, e sua maior importância está na infecção de outros órgãos (Gonçalves, 2009).

Muitas enfermidades em aves são acometidas por sorotipos patogênicos de *E. coli*, podendo causar morte, diminuição na produção de ovos e condenação de carcaças nos

abatedouros. A forma mais grave da doença é denominada de colisepticemia, caracteriza-se pela presença da bactéria no sangue, colonizando outros órgãos, como o coração, fígado e pulmão (Barnes et al., 2008).

Apesar da relação de mutualismo com o hospedeiro, essas bactérias possuem sorotipos com características distintas de virulência, classificadas em patotipos diarréiogênicos (DEC) e extraintestinais (EXPEC). Dessa maneira, as estirpes patogênicas são nocivas à saúde humana ou animal (Croxen; Finlay, 2010).

O grupo (DEC) são as bactérias que provocam problemas de ordem intestinal classificadas em: enteropatogênica, enterotoxigênica, enteroinvasiva, enterro-hemorrágica, enteroagregativa (Ferreira; Knöbl, 2009). O grupo das (EXPEC) são: *E. coli* uropatogênica, *E. coli* de meningite neonatal e *E. coli* patogênica para aves (APEC), responsáveis por complicações no trato urinário, meningite e septicemia respectivamente (Kaper et al., 2004).

Klebsiella sp

Pertencente ao Filo *Proteobacteria*, é uma bactéria Gram-negativa e capsulada. São anaeróbicas facultativas. Encontradas na água, no solo, em vegetais, carne, insetos, faz parte da microbiota normal do TGI de diversos animais, incluindo os homens (Bagley, 2015). É encontrada na avicultura e causa principalmente problemas respiratórios em frangos e a infecção apresenta alta taxa de mortalidade (Hamza et al., 2016).

Salmonella sp

Pertencente ao Filo *Proteobacteria*, é uma bactéria aeróbica ou anaeróbica facultativa, Gram-negativa que habita a microbiota intestinal do ceco (Cruz, et al., 2022). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, composta por duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta classificação está de acordo com os três grupos de estruturas superficiais expressas no lipopolissacarídeo bacteriano (Popoff et al., 2004).

A *S. enterica* é classificada em duas espécies, seis subespécies e mais de 2.600 variantes sorologicamente distinguíveis, mas apenas algumas são responsáveis por doenças

nas aves. Na produção avícola, as infecções por salmonelas são geralmente divididas em duas categorias principais, a febre tifóide aviária e a doença pullorum (Lan et al., 2009).

A *Salmonella* sp pertence a um grupo de bactérias que podem viver no trato intestinal dos animais. Estão amplamente distribuídas na natureza, especialmente em animais de criação, como galinhas, porcos e gado, bem como no solo e na água (Kim, 2018).

São bactérias consideradas parte da microbiota intestinal de muitos mamíferos, incluídos os seres humanos e algumas espécies de aves, sendo apontadas como importantes patógenos aviários (Gerlach et al., 1994). Em aves é uma bactéria causadora de injúrias no TGI, penetra na lâmina própria via enterócito e invade outros órgãos como baço, fígado, pâncreas, ovário e oviduto (Müller, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência da densidade da casca de ovos férteis sobre o desempenho e aspectos sanitários de embriões e frangos.

2.2 Específicos

- Avaliar as taxas de eclosão e eclodibilidade dos ovos de acordo com a densidade da casca e a presença do vírus da BIG das matrizes;
- Avaliar os parâmetros sanitários dos embriões de acordo com a densidade da casca dos ovos e a presença do vírus de BIG das matrizes;
- Avaliar a positividade do vírus da BIG em embriões de acordo a densidade da casca dos ovos e presença do vírus da BIG nas matrizes;
- Avaliar os parâmetros zootécnicos dos frangos de acordo com a densidade da casca dos ovos e a presença do vírus de BIG das matrizes;
- Avaliar as taxas de eclosão e eclodibilidade dos ovos de acordo com a densidade da casca e local de postura;
- Avaliar a composição da microbiota intestinal de pintos de acordo com a densidade da casca e local de postura dos ovos.

3 INFLUÊNCIA DA BRONQUITE INFECCIOSA SOBRE A DENSIDADE DA CASCA DE OVOS FÉRTEIS E O DESEMPENHO DE EMBRIÕES E FRANGOS

Alethéia Rotta Padilha^{1,4}, Maria Giovanna de Araújo Menezes³, Vanessa Peripolli^{1,3}, Teane Milagres Augusto Gomes² Larissa Pickler⁴, Denize Maciel⁴, Fabiana Moreira^{1,3},

¹Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal (PPGPSA), Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, SC, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal (PPGPSA), Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, SC, Brasil.

³Núcleo de Ensino, Extensão e Pesquisa em Produção Animal (NEPPA), Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, SC, Brasil.

⁴Empresa BRF S/A, Capinzal, SC, Brasil.

3.1 Introdução

São inúmeros e constantes os desafios do segmento de produção de aves, devido à crescente demanda pelos produtos avícolas e as exigências dos mercados. Isto têm levado a uma intensa pressão em todos os setores da cadeia avícola, a fim de melhorar a taxa de crescimento, a eficiência alimentar e o *status* sanitário (Silva et al., 2022).

A qualidade da casca é um dos fatores de maior importância para o bom rendimento da incubação. A integridade da estrutura da casca dos ovos reflete na resistência e espessura, alterando a qualidade da casca para formar um ovo casca fina ou casca normal (McClelland et al., 2019).

A densidade da casca de ovos \leq a 1.080, favorece os nascimentos de pintos viáveis (Heier et al., 2001). A espessura da casca dos ovos também evita a perda de água e possibilita trocas gasosas para o desenvolvimento do embrião (Attard; Portugal, 2021).

Fatores de origem infecciosa também podem resultar em piora na qualidade dos ovos, como por exemplo, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG). A BIG é um *Gammacoronavírus* que, ao infectar aves adultas, resulta em queda da produção, postura de ovos deformados ou com alteração da casca (fina e porosa) e má qualidade do albúmen (Quinteros et al., 2022).

Quando as aves são infectadas, ocorre diminuição na produção e qualidade interna e externa dos ovos, diminuição da eclodibilidade, diminuição da eficiência alimentar, por isso, a grande importância econômica dessa doença (Hipólito et al., 1979).

Baseado neste contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da Bronquite Infecciosa sobre a densidade da casca de ovos férteis e o desempenho de embriões e frangos.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Comitê de Ética

Os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Catarinense (IFC) - Campus Araquari, aprovado sob o protocolo de número 391/2022.

3.2.2 Local e Animais

O estudo envolveu granjas de matrizes, incubatório e granja experimental de frango. As matrizes do estudo pertenciam a linhagem Ross Ap91[®] com 60 semanas de idade e localizadas no Meio Oeste Catarinense. Foram utilizados ovos de matrizes comprovadamente negativas e positivas para o vírus de BIG. Seguindo a metodologia de pontuação da empresa integradora, quanto maior a pontuação, mais falhas de biossegurança.

Granja de matrizes BIG negativa

A granja de matrizes BIG negativa, possuía 42.000 matrizes, distribuídas em seis aviários. A nota média de auditorias de Boas Práticas de Produção (BPP) foi de 90%. A granja possuía nota de 26 pontos, considerada granja de baixo risco sanitário.

O sistema de coleta de ovos da granja era automatizado para coleta de ovos de ninho. A cama dos aviários foi constituída por maravalha de pinus, com altura de 10 cm e possuía regular qualidade no período do estudo. A granja possuía aviários de pressão negativa, trabalhando 100% com cortina fechada e ventilação lateral ou tipo túnel.

Granja de matrizes BIG positiva

A granja de matrizes BIG positiva, possuía 30.000 matrizes, distribuídas em quatro aviários. A nota média de auditorias de BPP foi de 87%. Quanto a biosseguridade, a granja possuía nota de 32 pontos, considerada granja de baixo risco sanitário.

O sistema de coleta de ovos da granja é automatizado para coleta de ovos de ninho. A cama dos aviários foi constituída por maravalha de pinus, com altura de 10 cm e possuía regular qualidade no período do estudo. A granja possuía aviários de pressão negativa, trabalhando 100% com cortina fechada e ventilação lateral ou tipo túnel

A granja possuía aviários de pressão positiva, ventilação de cortinas manual e climatização com o uso de ventiladores automáticos.

Incubatório de frango

O incubatório possuía área construída de 7.642 m², possuía 132 máquinas incubadoras de múltiplo estágio, sendo elas da marca (CASP M62[®], Brasil) e (PETERSIME VB504[®], Brasil). Possuía 66 nascedouros da marca (CASP G 21[®] e CASP 21RHE[®], Brasil). A capacidade de incubação de 11.206.000 ovos, com produção média de 9.245.000 pintinhos/mês.

Granja experimental de frango

A granja experimental de frango, possuía bebedouro tipo *nipple* (1:25 aves) e prato de comedouro (1:25 aves). As aves foram alojadas em cama dois, composta por maravalha de pinus, com espessura de 10 cm e houve retirada de partes molhadas ou compactadas durante o período experimental.

Os pintos foram alojados separados em 32 *boxes*, sendo oito *boxes* para cada tratamento. O tamanho de cada *box* foi de 1,48 metros de comprimento e 3,8 metros de largura. Foram 56 pintos alojados em cada *box*, permitindo a densidade de alojamento de 10,18 aves por m².

O programa de luz e ambiência dos frangos foi utilizado para estimular o consumo de ração e água. Foi utilizado o tipo de lâmpada led dimerizável, com as horas de luz programadas. A condição de ambiente foi a mesma para os 32 *boxes* dos quatro tratamentos, a climatização foi realizada através de ventiladores de pressão positiva e manejo de cortinas. O aquecimento ambiental foi por meio de aquecedores a gás e elétricos com controle e ajuste automático de temperatura, diferenciando dependendo da idade do frango (Tab. 1).

Tabela 1. Programa de luz e temperatura dos aviários conforme a idade dos frangos.

Idade (dias)	Lux	Horas luz	Horas escuro	Temperatura aviário
1°	40	23	1	33°C
2° a 7°	40	20	4	30°C
8° a 9°	10	16	8	-
8° a 14°	-	-	-	28°C
10° a 21°	20	18	6	-
15° a 21°	-	-	-	26°C
22° a 28°	-	-	-	23°C
22° a 31°	20	18	6	-
29° a 35°	-	-	-	21°C
32° a 39°	20	18	6	-

36° a 42°	-	-	-	18°C
40° a 42°	20	23	1	-

Fonte: Manual de Boas Práticas de Produção de Frangos de Corte – BRF, 2020.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em quatro tratamentos experimentais, em esquema fatorial 2x2. As amostras de ovos dos quatro tratamentos foram identificadas como T1, T2, T3, T4, sendo 1.462 ovos para cada tratamento. A quantidade total de ovos enviados para incubação dos quatro tratamentos foi de 5.848 ovos. Foram utilizados 448 pintos para cada tratamento, totalizando 1.762 frangos com oito repetições, avaliados em granja experimental.

As matrizes que originaram os ovos dos tratamentos possuíam o *status* sanitário e a densidade da casca dos ovos (Tab. 2).

Tabela 2. Tratamentos do estudo de acordo com a densidade da casca dos ovos e diagnóstico para o vírus de BIG.

Tratamento	Densidade da casca dos ovos	Quantidade de ovos	Presença de BIG
T1	Casca normal (= 1,080)	1.462	Negativa
T2	Casca fina (= 1,070)	1.462	Negativa
T3	Casca normal (= 1,080)	1.462	Positiva
T4	Casca fina (= 1,070)	1.462	Positiva

Avaliações nas matrizes pesadas

Coletas de soro e análises sorológicas nas matrizes pesadas

As coletas de soro das matrizes BIG negativa e BIG positiva, foram realizadas na fase de recria e na produção nas idades de 12, 18, 24, 30, 42, 48 e 60 semanas de vida. O sangue foi coletado em seringas de 5 mL através da punção venosa da veia ulnar de machos e fêmeas de várias partes do galpão no número de 20 animais por lote, totalizando 160 amostras por granja, posteriormente, transferindo para tubo de ensaio com ativador de

coágulo, conforme metodologia da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS, 2013).

As análises de ELISA para o vírus de BIG, foram realizadas no Laboratório de Saúde Animal (LSA), foi utilizado o kit teste da empresa IDEXX®. Para leitura e interpretação dos resultados dos títulos sorológicos, foi utilizado o programa x-Chek®, que possuía o banco de dados com os valores de títulos sorológicos esperados de acordo com cada idade de coleta.

O protocolo de vacinação das matrizes para o vírus de BIG (cepa Massachusetts – Ma5), da empresa MSD® está descrito abaixo:

- (i) 1ª vacinação com vacina viva liofilizada contra BIG, sorotipo Massachusetts, via de aplicação ocular, idade de cinco dias.
- (ii) 2ª vacinação com vacina viva liofilizada contra BIG, sorotipo Massachusetts, via de aplicação spray, idade de oito semanas.
- (iii) 3ª vacinação com vacina inativada contra o Reovírus Aviário, Bronquite Infeciosa (sorotipo Massachusetts e D274/D207), Doença de Gumboro e Doença de Newcastle, via de aplicação intramuscular, idade de 12 semanas;
- (iv) 4ª vacinação com vacina inativada contra o Reovírus Aviário, Bronquite Infeciosa (sorotipo Massachusetts e D274/D207), Doença de Gumboro e Doença de Newcastle, via de aplicação intramuscular, idade de 17 semanas;
- (v) 5ª vacinação com vacina viva liofilizada contra BIG, sorotipo Massachusetts, via de aplicação spray, idade de 19 semanas.

Coletas de órgãos de matrizes para análise de RT-PCR.

Na granja de matrizes BIG positiva, com 27 semanas de idade as aves apresentaram sinais respiratórios e queda de produção de ovos. Foi realizada coleta de fragmentos do intestino delgado de cinco matrizes. O *pool* de intestino foi enviado ao LSA, para serem submetidos à técnica RT-PCR para BIG.

Classificação dos ovos

Os ovos utilizados para o experimento foram coletados na segunda coleta do dia. Após o processo de desinfecção dos ovos com oxiclureto de cálcio 200 p.p.m. através do uso da Máquina de Desinfecção de Ovos (modelo FRMDO, Fornari®, Brasil), os ovos foram destinados a sala de ovos para passarem pelo primeiro processo de triagem e diferenciação dos ovos destinados ao experimento, de forma visual os ovos foram separados, diferenciados pela cor.

Os ovos mais claros foram identificados como ovos de casca fina e os demais ovos, como ovos de casca normal, fundamentados pela Figura 2, onde se observa as duas categorias de ovos, (a) ovos não incubáveis e (b) ovos incubáveis, destacando o ovo casca fina.

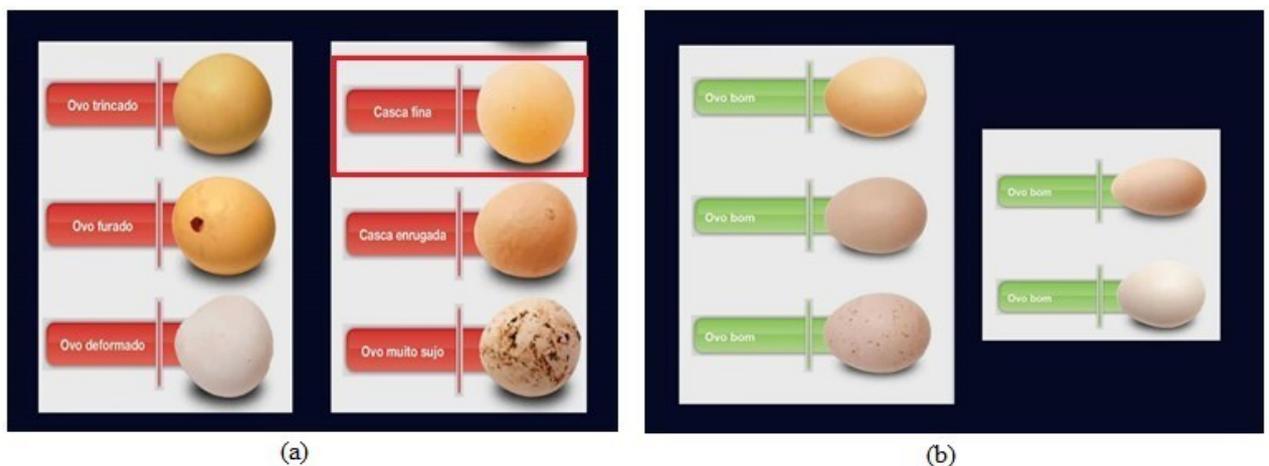


Figura 2. Categorias de ovos férteis selecionados para incubação. (a) Ovos Não Incubáveis, destacando ovo casca fina em vermelho; (b) Ovos Incubáveis.

Fonte: Aviagen, (2011).

As bandejas de incubação foram identificadas com etiquetas de acordo com o tratamento. Os ovos ficaram armazenados na sala de ovos da granja por 24 horas em temperatura ambiente controlada de 24°C e umidade relativa de 60%, foram transportados ao incubatório em temperatura controlada de 22°C e umidade relativa de 70%.

Avaliações no incubatório

Teste de gravidade específica da casca dos ovos

Os ovos ficaram estocados por sete dias pós-postura das matrizes antes de iniciar o teste de gravidade específica (GE) armazenados em temperatura controlada de 20°C, umidade relativa de 65%.

Aplicando a metodologia utilizada por Guntzel, (2015), para o teste de GE, foram categorizados como ovos com densidade de 1,070, sendo ovos de casca fina, e com densidade \geq a 1,080 ovos de casca normal. A quantidade total de ovos utilizados para incubação foi 5.846 ovos, dos quatro tratamentos. Para realizar o teste de GE, os ovos foram separados por granja e foram utilizados quatro baldes com diferentes níveis de sal e água clorada. Cada balde representava cada categoria de densidade específica da casca do ovo. Os quatro baldes foram identificadas com quatro categoria de densidade, sendo elas de 1,065, 1,070, 1,075 e 1,080.

Para corrigir solução de salina obtida, foi utilizado o auxílio de densímetro de massa específica (modelo 1000 a 1.100/250 ml, Incoterm®, EUA). Quando a densidade apresentava valor abaixo do identificado em cada categoria foi adicionado pequena quantidade de sal, e quando estava acima de cada categoria, foi adicionado água clorada. A cada 1.032 ovos passados na solução de 1,065, todas as soluções eram aferidas e corrigidas para a densidade específica identificada em cada balde. O objetivo dessa atividade foi manter a densidade das soluções conforme o especificado para cada tratamento.

Caso as densidades apresentem valores abaixo do especificado, adicionar pequena quantidade de sal, caso esteja acima, adicionar água. O ovo que flutua confere a densidade específica contida na solução de salina da bacia, e o ovo que encosta no fundo da bacia, deverão ser mergulhados na posterior bacia com densidade superior (Guntzel, 2015).

Os ovos com densidade \leq 1,065 e ovos com densidade maior que 1,080 não foram utilizados para o experimento. Os ovos que flutuavam no balde de densidade de 1,070 foram destinados para bandejas de incubação identificados como casca fina,

correspondendo aos tratamentos T2 e T4. Os ovos com densidade específica igual a 1,080 foram destinados para bandejas de incubação identificados como casca normal.

Incubação dos ovos

O processo de incubação artificial para os quatro tratamentos foi submetido às mesmas condições de tempo de estoque e máquina de incubação. Seis horas antes da incubação, os ovos foram enviados para sala de incubação, com temperatura de 26°C e umidade relativa de 55%.

Os carrinhos ficaram alocados em frente a máquina de incubação por seis horas, passando pelo processo de pré-aquecimento. Após o pré-aquecimento os carrinhos foram colocados em incubadora de múltiplo estágio (CASP M62®, Brasil).

A temperatura do ar dentro da incubadora foi de 37,5°C e a umidade relativa para a incubação foi de 60% durante 24 horas. Os ovos eram virados automaticamente a 45°C a cada hora e aos 19 dias de incubação foram vacinados *in ovo* com a vacina (Vaxxitek®) para doenças de Marek, Bouba e Gumboro, através da vacinadora (Embrex Inc. NO IOM.007, Estados Unidos da América) e, então, transferidos para o nascedouro (CASP G21®, Brasil).

Coleta de ovos embrionados com 19 dias de incubação

No 19º dia de incubação dos ovos, foi realizada a coleta de ovos embrionados dos quatro tratamentos. Foram separados 20 ovos de cada tratamento (n=80), acondicionados em bandejas e transportados ao LSA, para serem submetidos à técnica RT-PCR.

O *kit* utilizado pelo laboratório para análises de RT-PCR de BIG é adquirido pronto da empresa Simbios Biotecnologia®, denominado de *Kit* NewGene IBVAmp e o primer utilizado o qual não revela as sequências de primers utilizados.

Nascimento dos pintos

Os ovos dos quatro tratamentos foram enviados para o mesmo nascedouro e, durante os três dias, ficando mantidos a uma temperatura de 36,6°C e umidade relativa de 85%.

Durante os três dias do nascedouro, os ovos foram nebulizados com uma solução de desinfetante ácido peracético a 450 ppm, utilizando 45 mL de solução para cada aspersão para um nascedouro. As desinfecções ocorreram a cada 30 minutos e iniciaram no primeiro momento da transferência até o nascimento dos pintos. Após o prazo de 21 dias de incubação artificial, foi contabilizada a eclosão e a eclodibilidade de cada tratamento, separando os pintos de primeira e demais resíduos para realização do embriodiagnóstico, para análise de dados de cada tratamento.

Embriodiagnóstico e avaliação dos parâmetros zootécnicos

O embriodiagnóstico foi realizado com base no Manual de Dicas de Incubação da Aviagen®, (2010), sendo avaliado as fases de mortalidade embrionária de cada tratamento e quantificar a taxa de eclosão, de eclodibilidade e de mortalidade dos embriões provenientes dos ovos casca normal e ovos de casca fina da granja positiva e da granja negativa para o vírus de BIG. Os ovos foram quebrados pela câmara de ar, separando os ovos não eclodidos, identificando e registrando os dados, sempre pelo mesmo operador. O estágio de desenvolvimento do embrião de cada amostra foi separado e identificado, classificando-os em grupos usando como referência (Tab. 3).

Tabela 3. Classificação de mortalidade embrionária por fase de acordo com o exame de embriodiagnóstico.

Dias de incubação	Classificação	Observação
0	Infértil	Nenhum sinal evidente de embrião
1	Morte Precoce	Membranas extraembrionárias de cor creme, ocupando uma área de até 1 cm de diâmetro
2	Morte Precoce	Membranas extraembrionárias de cor creme, ocupando uma área de até 3 cm de diâmetro
2,5 – 4	Anel de Sangue	Anel de sangue evidente e o começo da formação do fluido embrionário
5 – 12	Olho Preto	Pigmentação preta do olho do embrião é evidente, as asas e as pernas podem ser vistas também
13 – 17	Penas	Existem penas. Embora as primeiras penas sejam vistas já aos 11 dias
18 – 19	Virado	O embrião está se mexendo da posição cabeça entre as pernas, para a posição de eclosão e a gema permanece fora do corpo do embrião
20	Bicado vivo e bicado morto	O bico do embrião quebrou a casca e não conseguiu eclodir. Se encontrado vivo, bicado vivo. Se morto, bicado morto
1 – 21	Contaminação bacteriana	Forte descoloração do conteúdo do ovo com emissão de maus odores
1 – 21	Contaminação fúngica	Colônias de fungos aparentes na câmara de ar dos ovos

Fonte: Aviagen, (2010).

Foi identificada as fases de mortalidade embrionária bem como retirado e contabilizado todos os pintos mortos por bandeja, sendo um número total de 1.462 ovos incubados por tratamento.

Para a obtenção do percentual de eclosão foi realizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de eclosão} = \frac{\text{Pintos Nascidos}}{\text{Ovos Incubados}} * 100$$

A taxa de eclosão foi obtida utilizando o número de pintos nascidos de cada tratamento, dividido por 1.462 ovos férteis e multiplicado por 100.

Para obtenção do percentual de eclodibilidade foi realizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Eclodibilidade} = \frac{\text{Ovos incubáveis} - \text{Ovos Inférteis}}{\text{O. Férteis}} * 100$$

A taxa de eclodibilidade foi obtida após diminuído o percentual de ovos inférteis encontrados. Após a conferência de eclosão, os pintos nascidos dos quatro tratamentos foram separados em caixas plásticas com capacidade máxima de 100 pintos cada e identificados novamente por tratamento.

Foram separados 448 pintos machos para cada tratamento, totalizando 1.792 pintos.

Avaliações no frango

Manejos produtivos dos frangos

Para cada fase de vida, as aves consumiram uma categoria diferente de ração, sendo que do dia do alojamento até os 21 dias de idade, receberam ração inicial. Com 22 a 35 dias de idade receberam ração crescimento, e com 36 a 42 dias receberam ração final, até 12 horas antes do carregamento para abate, que ocorreu com 42 dias de vida. A ração fornecida para os frangos possuía a mesma condição nutricional (Tab. 4).

Tabela 4. Valores nutricionais da ração fornecida aos frangos após o alojamento.

Descrição (vol. baseados em bateladas de 4.000 Kg)	Ração Inicial - %	Ração Crescimento - %	Ração Final - %
Milho a Granel	57,65	66,88	69,89
Farelo de soja a Granel	37,46	30,06	26,41

Calcário Fino	1,51	1,35	1,15
Fosfora Monocalcico	1,08	0,40	0,61
Óleo soja degomado a Granel	0,90	0,44	0,81
Sal granulado com iodo	0,56	0,32	0,39
DL-Metionina em pó a Granel	0,30	0,08	0,26
Sulfato de lisina	0,26	0,30	0,00
Vitamina cloreto de colina liquida	0,09	0,01	0,06
Aditivo conservante	0,06	0,01	0,03
L-Treonina em pó	0,06	0,07	0,07
Aditivo conservante	0,04	0,03	0,08
Produto para digestibilidade	0,01	0,00	0,01
Enzimas e fitogênicos	0,01	0,00	0,01
Erva mate peneirada	0,00	0,07	0,00
Premix vitamínico mineral	0,00	0,00	0,23

Fonte: Manual de Boas Práticas de Produção de Frangos de Corte – BRF, 2020.

Avaliação dos parâmetros zootécnicos

A pesagem das aves foi realizada com as aves em jejum, em balança digital e em quatro momentos distintos; sendo a primeira no dia do alojamento no fornecimento da ração inicial, a segunda com 21 dias comendo ração crescimento, a terceira aos 35 dias quando iniciou o consumo da ração final, a quarta aos 42 dias, consumindo ração final.

Os parâmetros zootécnicos avaliados foram o ganho de peso de um dia, peso médio, conversão alimentar e a mortalidade dos frangos durante o período de 0 a 42 dias. O ganho de peso de um dia foi calculado, dividindo o peso dos frangos em cada pesagem (21, 35 e 42 dias de vida), pelo peso dos frangos no dia do alojamento.

Para calcular o peso médio das aves foi subtraído o peso das aves aos 42 dias pelo peso dos pintos no dia do alojamento. A conversão alimentar foi medida pelo consumo total de ração das aves, dividido pelo seu peso médio. A mortalidade dos frangos foi calculada, dividindo o número total de aves carregadas aos 42 dias pelo total de aves alojadas.

3.2.3 Análise estatística

A análise foi realizada com os dados de desempenho dos ovos e embriões no incubatório e dos frangos na granja experimental e testados quanto à normalidade da distribuição e homogeneidade dos resíduos através dos testes de Shapiro Wilk e de Levene, respectivamente. Dados paramétricos foram analisados através do procedimento MIXED em

um modelo que incluiu a densidade da casca do ovo e o vírus de BIG como efeito fixo. O efeito aleatório de bandeja foi considerado para os dados de incubatório e o efeito aleatório de box foi considerado para os dados de desempenho.

Interações entre a densidade da casca do ovo e vírus de BIG foram testadas. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Usando o critério de informação de Akaike, a estrutura de componentes da variância (VC) foi considerada como o melhor modelo para a estrutura de covariância residual.

Os dados não paramétricos foram analisados através do procedimento NPAR1WAY (Kruskal Wallis) e as médias foram comparadas pelo método DSCF (Dwass-Steel-Critchlow-Fligner). As análises foram realizadas no programa *Statistical Analysis System Inst. Inc.*, Cary, NC, versão 9,4, e diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3.3 Resultados

Avaliações nas matrizes pesadas

Análises sorológicas nas matrizes

Os resultados de titulações das matrizes BIG negativa, foram comparados aos resultados de titulações dos valores de títulos sorológicos esperados de acordo com cada idade de coleta. Em todas as idades de coleta, observa-se que os resultados de títulos sorológicos são semelhantes e dentro do esperado. Observa-se que em todas as idades monitoradas espera-se no máximo 13.000 de títulos médios de anticorpos.

Na idade de 30 semanas, observa-se o maior resultado apresentando 12.645 de titulação de anticorpos, como demonstra a Figura 3. Além disso, foi possível observar que após a idade de 30 semanas, a titulação está em decréscimo, demonstrando que as matrizes não tiveram positividade para o vírus de BIG até as 60 semanas.

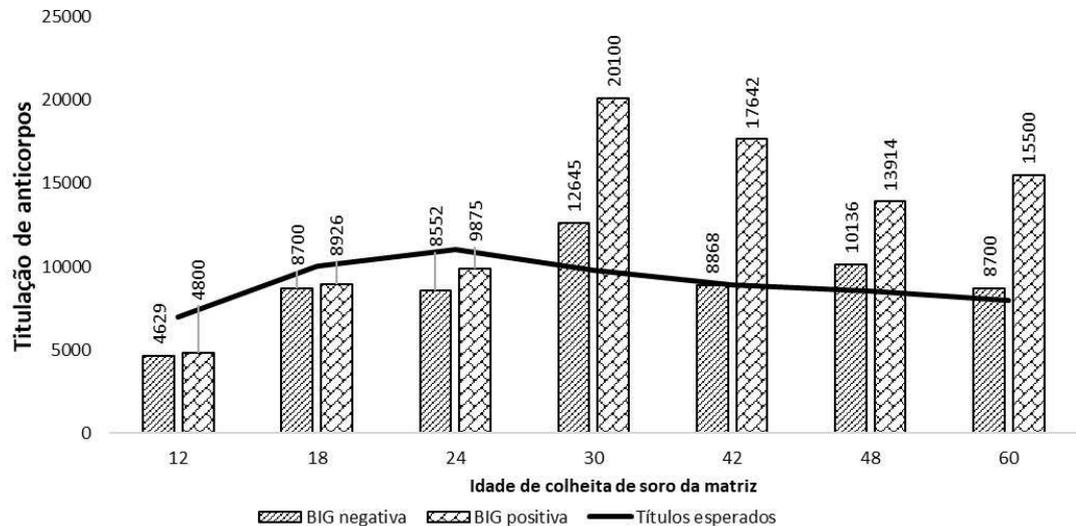


Figura 3. Resultados da titulação das granjas de matrizes BIG negativa e BIG positiva.

Foi observado que nas semanas 30, 42, 48, 60 das matrizes BIG positiva, as titulações foram superiores comparados aos títulos médios esperado, apresentando 20.100, 17.642, 13.914, 15.500 de titulação de anticorpos, respectivamente, como demonstra a Figura 3, indicando que as matrizes foram desafiadas para o vírus de BIG entre as idades de 24 e 30 semanas.

Análises de RT-PCR dos órgãos de matrizes

O resultado do *pool* de intestino das matrizes coletados com 27 semanas de idade, apresentou resultado positivo para o vírus de BIG, cepa Brasileira BR.

Avaliações no incubatório

Análise de RT-PCR dos ovos embrionados

Das avaliações para os 80 ovos embrionados com 19 dias de incubação dos quatro tratamentos, todos apresentaram resultado negativo para o vírus de BIG nas análises realizadas por RT-PCR do líquido alantoide.

Análise de desempenho

Não houve efeito da interação entre densidade da casca do ovo e a positividade das matrizes para o vírus de BIG sobre a taxa de eclosão e a taxa de eclodibilidade ($P > 0,05$) (Tab. 5). Entretanto, foi observado que ambas as taxas foram maiores para ovos de casca normal e ovos oriundos de matrizes BIG negativa ($P < 0,05$).

Os resultados de contaminação bacteriana e fúngica, mortalidade inicial e intermediária, pintos de descarte foram maiores para ovos de casca fina ($P < 0,05$). Assim como, os resultados de pintos de descarte, contaminação bacteriana e fúngica, mortalidade final e ovos bicados mortos foram maiores para ovos oriundos de matrizes BIG positiva ($P < 0,05$).

Tabela 5. Efeito da densidade da casca do ovo e a positividade das matrizes para BIG sobre os parâmetros zootécnicos de incubatório.

Parâmetro	Casca do ovo		Matriz positiva		Mean	EPM	Pr>F		
	Normal	Fina	Não	Sim			Casca	Matriz positiva	Casca × Matriz positiva
Taxa de Ecloração, %	70,28 ^a	59,16 ^b	69,80 ^a	59,64 ^b	64,72	1,5764	<0,0001	<0,0001	0,2909
Taxa de Eclodibilidade, %	81,75 ^a	67,03 ^b	79,21 ^a	69,58 ^b	74,39	1,5282	<0,0001	<0,0001	0,8309
Pintos descarte, %	1,29 ^b	3,31 ^a	1,26 ^b	3,35 ^a	2,30	0,3264	0,0021	0,0015	-
Ovos inférteis, %	14,53	12,14	11,96	14,70	13,33	0,9035	0,2818	0,4568	-
Mort. Inicial %	3,96 ^b	5,64 ^a	4,54	5,06	4,80	0,3597	0,0170	0,2892	-
Contaminação Bacteriana, %	2,18 ^b	5,81 ^a	2,46 ^b	5,54 ^a	4,00	0,5055	<0,0001	0,0003	-
Mort. Intermediária, %	2,46 ^b	4,75 ^a	3,35	3,86	3,60	0,2714	<0,0001	0,3469	-
Contaminação Fúngica, %	0,06 ^b	0,51 ^a	0,17 ^b	0,40 ^a	0,29	0,0660	0,0006	0,0304	-
Mort. Final %	0,47	0,75	0,37 ^b	0,85 ^a	0,61	0,1046	0,3305	0,0217	-
Bicados vivos*, %	0,17	0,82	0,75	0,23	0,49	0,1546	0,0634	0,4262	-
Bicados mortos**, %	0,51	0,58	0,30 ^b	0,78 ^a	0,56	0,0787	0,8324	0,0027	-

Pr>F: probabilidade, EPM: erro padrão da média, letras minúsculas diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ou DSCF a 5% (P<0,05). *Bicados vivos: Ovo bicado com embrião vivo **Bicados mortos: ovo bicado com o embrião morto.

Avaliações na granja experimental

Desempenho dos frangos na granja experimental

Não houve efeito da interação da densidade da casca dos ovos e positividade do vírus da BIG sobre o desempenho dos frangos em nenhum parâmetro avaliado ($P>0,05$). No entanto a taxa de mortalidade de 1 a 21 dias, peso de 1 dia, (CA) de 1 a 21 dias e (CA) de 42 dias dos frangos apresentaram diferenças em relação aos tratamentos (Tab. 6).

A taxa de mortalidade dos frangos aos 22 a 35 dias, peso 1 dia e CA de 42 dias foi maior nas aves oriundas de ovos de matrizes positivas para BIG ($P<0,05$), enquanto frangos provenientes de ovos de casca fina apresentaram melhor CA aos 42 dias em comparação aos frangos oriundos de ovos de casca normal. No entanto, o peso e a CA dos frangos nas demais fases avaliadas) não foi influenciado pela densidade da casca do ovo, nem pela positividade de BIG nas matrizes ($P>0,05$).

Tabela 6. Efeito da densidade da casca do ovo e do vírus de BIG sobre os parâmetros de desempenho de frangos.

Parâmetro	Casca do ovo		Vírus de BIG		Mean	EPM	Pr>F		
	Normal	Fina	Não	Sim			Casca	Vírus de BIG	Casca × vírus de BIG
Mortalidade 1 a 21 dias, %	1,45	2,34	2,01	1,78	1,89	0,2395	0,0577	0,6280	-
Mortalidade 22 a 35 dias, %	1,45	2,12	1,00 ^b	2,56 ^a	1,78	0,2777	0,2605	0,0049	-
Mortalidade 36 a 42 dias, %	0,33	0,22	0,33	0,22	0,27	0,1167	0,6318	0,6318	-
Peso dia 1, g	49,11 ^b	49,74 ^a	48,65 ^b	50,20 ^a	49,43	0,1821	0,0061	<0,0001	0,2571
Peso 21 dias, g	840,87	839,27	841,26	838,88	840,06	6,0166	0,8819	0,8248	0,1523
Peso 35 dias, kg	2,17	2,16	2,16	2,17	2,17	0,0121	0,6678	0,7729	0,8369
Peso 42 dias, kg	2,81	2,82	2,81	2,82	2,81	0,0116	0,7346	0,4901	0,4927
CA 21 dias, kg/kg	1,270	1,260	1,270	1,260	1,260	0,0047	0,0516	0,3826	0,0557
CA 35 dias, kg/kg	1,490	1,480	1,480	1,490	1,480	0,0036	0,1961	0,3554	0,3265
CA 42 dias, kg/kg	1,630 ^a	1,610 ^b	1,610 ^b	1,630 ^a	1,620	0,0042	0,0357	0,0265	0,6391

Pr>F: probabilidade, EPM: erro padrão da média, letras minúsculas diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ou DSCF a 5% (P<0,05).

3.4 Discussão

Este estudo mostrou que a densidade da casca do ovo e a presença do vírus de BIG nas matrizes pode afetar o desempenho dos embriões e dos frangos, de forma independente para a maioria das variáveis analisadas.

A avaliação de gravidade específica é uma técnica importante para determinar a densidade do ovo, pois gera uma resposta direta em relação à densidade da casca (Arslan; Yamak, (2020)). Neste estudo os ovos considerados de casca normal apresentaram uma densidade igual a 1,080, o que de acordo com Arslan; Yamak, (2020), são aqueles que apresentam os melhores resultados, uma vez que ovos contendo densidades \leq a 1,075 terão casca mais fina, e, portanto, maior perda de umidade e redução na taxa de eclosão.

Dessa forma, a densidade da casca pode influenciar a capacidade do ovo de resistir à colonização bacteriana e fúngica e por agir como barreira evitando a contaminação ao embrião. Portanto, isto sugere que ovos de casca normal estão associados a uma menor mortalidade e menor probabilidade de contaminação bacteriana ou fúngica, uma vez que os ovos de casca íntegra, estão menos sujeitos a contaminação microbiana (Rosa; Avila, 2000).

A densidade da casca dos ovos também pode ser um fator que influencia a contaminação dos ovos, pois ovos com densidade \leq a 1,070 estão relacionados ao aumento de porosidade da casca, e, portanto, maior facilidade de contaminação microbiana por fragilidade da barreira natural de proteção do embrião (Rosa; Avila, 2000).

A idade da matriz é um fator que influencia a qualidade da casca dos ovos, pois matrizes com idade superior a 56 semanas, produzem uma proporção maior de ovos com cascas de densidade \leq a 1,070, refletindo em piora dos índices de eclosão (Rosa; Avila, 2000). Porém, neste estudo não foi avaliado matrizes com diferentes idades em relação a densidade da casca, no entanto o grupo do estudo envolveu matrizes no final da vida produtiva com 60 semanas, ou seja, que poderiam apresentar maiores chances de produzirem ovos de casca fina.

Foi observado que a densidade da casca do ovo impactou nos parâmetros avaliados do incubatório, sendo que os resultados mais baixos observados nos grupos com ovos de casca fina. Estes dados estão de acordo com estudos apresentados por Bölükbasi et al., (2008), que registraram ovos de casca fina apresentando maior incidência de mortalidade embrionária, menor peso ao nascimento dos pintos e maior mortalidade pós-nascimento em comparação com pintos provenientes de ovos de casca normal.

Tendo em vista que ovos de casca fina apresentaram maior taxa de contaminação fúngica e bacteriana, Daryabari et al., (2016) descreveram que ovos de casca fina que apresentam maior incidência de contaminação por bactérias e fungos, podem apresentar redução na qualidade dos pintos produzidos e maior taxa de mortalidade.

Neste estudo as taxas de mortalidade inicial e intermediária foram superiores nos ovos de casca fina em comparação aos ovos de casca normal, assim, o embrião encontra-se mais vulnerável a lesões e infecções pela menor proteção fornecida pela casca mais fina. Para Barbosa et al., (2008) durante o processo de incubação a casca do ovo desempenha um papel fundamental por proteger o embrião contra a invasão microbiana, controlar a troca de água e gases através dos poros e fornecer cálcio essencial para o desenvolvimento do embrião.

O presente estudo, avaliou o efeito da densidade da casca do ovo sobre o desempenho do frango de 1 a 42 dias, mostrando que ovos de casca normal apresentam melhores resultados em peso de 1 dia e mortalidade de 1 a 21 dias, de encontro com o estudo realizado por Mohiti-Asli et al., (2018), os quais encontraram melhores resultados de conversão alimentar dos frangos oriundos de ovos de casca normal. De acordo com estes autores os ovos de casca normal fornecem menores taxas de perda de umidade para o embrião, originando um pintinho de maior peso ao nascer e conseqüentemente com menor probabilidade de mortalidade, melhorando o indicador de conversão alimentar, que é formado também pelo parâmetro de mortalidade.

Um estudo realizado por Duman; Sekeroglu, (2017) demonstraram uma relação positiva entre a densidade da casca do ovo e o peso inicial do pinto, uma vez que a casca de

ovo com maior densidade oferece melhores condições de desenvolvimento dos pintos durante a fase embrionária, por conferir maior proteção contra impactos mecânicos e contaminação bacteriana e fúngica.

A presença do vírus de BIG também afeta outros parâmetros zootécnicos, demonstrando uma redução do desempenho dos frangos como queda de ganho de peso incluindo aumento na taxa de mortalidade Gulbahar et al., (2018), no estudo realizado por Chousalkar et al., (2021) encontraram uma redução significativa no peso de pintos de um dia oriundos de matrizes positivas para o vírus de BIG em comparação com pintos de matrizes negativas.

Os resultados deste estudo mostraram que a presença do vírus de BIG nas matrizes teve um impacto significativo sobre a taxa de eclosão, eclodibilidade e qualidade dos pintos, com maior incidência de pintos descarte, contaminação por bactérias e fungos, mortalidade final e ovos bicados com o embrião morto nos ovos.

De acordo com estudo conduzido Cavanagh, (1992), o vírus de BIG se replica com altos títulos nas células epiteliais ciliadas da mucosa do aparelho respiratório, após a infecção, segue a fase de viremia por no máximo 48 horas, o que possibilita a distribuição viral para os diversos tecidos para os quais o agente possui tropismo, como o aparelho gênito-urinário e digestório, podendo promover lesões intensas nestes sistemas. Ao passo que, a infecção primária no trato respiratório superior pode resultar em doença menos severa do que quando a infecção primária ocorre no trato respiratório inferior (Murphy et al., 1999).

A influência da infecção pelo vírus da BIG sobre o desempenho e sobrevivência dos frangos, ocorre devido à redução no apetite, prejudicando a absorção de nutrientes e interferindo no desenvolvimento normal do sistema respiratório (Hutton et al., 2005). Além disso, outros estudos também constataram que a infecção pelo vírus resultou em aumento da mortalidade em frangos devido a susceptibilidade a complicações respiratórias, infecções secundárias e estresse, que pode resultar em morte (Koo et al., 2020).

No entanto, não foi observado positividade para o vírus da BIG nos embriões avaliados no incubatório advindos de matrizes, sejam elas positivas ou negativas no incubatório. De acordo com o estudo de Ramakrishnan; Kappala, (2019), a transmissão do vírus da BIG ocorre pela via horizontal, e não há evidências de transmissão vertical contudo pode haver contaminação do ovo pela casca no momento de postura dos ovos, iniciando contaminação do embrião pela carga viral eliminada nas fezes das matrizes.

Gulbahar et al., (2018) destaca a importância da prevenção e controle da infecção pelo vírus de BIG, que pode afetar significativamente a produção avícola e resultar em perdas econômicas. Medidas de biossegurança, como a higienização adequada dos equipamentos e instalações, uso de vacinas e controle da movimentação de aves, são essenciais para prevenir a disseminação do vírus de BIG (Bhuiyvan et al., 2021).

3.5 Conclusão

A densidade da casca do ovo e a presença do vírus de BIG nas matrizes influenciam a qualidade dos ovos e embriões produzidos, além de afetar o desempenho posterior dos frangos. Ovos de casca normal apresentaram maiores taxas de eclosão e eclodibilidade, além de menores percentuais contaminação bacteriana e fúngica, mortalidade inicial e intermediária e pintos de descarte em relação aos ovos de casca fina.

Pintos resultantes de ovos de casca fina, assim como oriundos de matrizes positivas para o vírus da BIG apresentaram um peso superior com 1 dia de idade, diferentemente da conversão alimentar, que foi melhor na fase final de produção para aqueles frangos oriundos de ovos de casca fina e de matrizes negativas para BIG.

4 REFERÊNCIAS

ARSLAN, A.; YAMAK, U. Comparison of different eggshell thickness measurement methods. **Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences**, Ancara, v. 44, n. 5, p. 1150-1153, out. 2020.

ATTARD, M.R.G.; PORTUGAL, S.T. Climate variability and parente nesting strategies influence gas Exchange across avian eggshells. **Proceedings. Biological Sciences**, Londres, v. 288, n. 1953, p. 1-9, jun. 2021.

Aviagen. **Como Investigar as Práticas de Incubação**. Qualidade de Rotina no incubatório. 2010. Disponível em: http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ovoincubavel.pdf>. Acessado em: 24 jun. 2023.

Aviagen. **O que é um ovo incubável de boa qualidade**. 2011. Disponível em: https://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/HatcheryTips-PT.pdf>. Acessado em: 21 abr. 2021.

BARBOSA, V.M.; CANÇADO, F.V.; BAIÃO, N.C.; LANA, A.M.Q.; LARA, L.J.C.; SOUZA, M.R. Efeitos da umidade relativa do ar na incubadora e da idade da matriz leve sobre o rendimento da incubação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.3, p.741-748, jun. 2008.

BHUIYAN, M.S. A.; AMIN, Z.; BAKAR, A. M. S. A.; SAALLAH, S.; YUSUF, N. H.M.; SHAARANI, S.M.; SIDDIQUEE, S. Factor Influences for Diagnosis and Vaccination of Avian Infectious Bronchitis Virus (Gammacoronavirus) in Chickens. **Veterinary Sciences**, Bern, v. 8, n. 3, p. 1-47, mar. 2021.

BÖLÜKBASI, S. C.; ÇELİK, L.; ÖZKAN, S.; YILDIZ, A. Effects of eggshell quality and broiler breeder age on hatching results. **The Journal of Applied Poultry Research**, Atenas, v. 17, n. 1, p. 95-102, 2008.

CAVANAGH, D.; D AVIS, P.J.; C OOK, J.K.A. Infectious bronchitis vírus: evidence for recombination within the Massachusetts serotype. **Avian Pathology**, v.21, p.401- 408, 1992.

CHOUSALKAR, K.K; KHAN, S.; MCWHORTER, A. Microbial quality, safety and storage of eggs. **Current Opinion In Food Science**, Amsterdã, v. 38, n. 1., p. 91-95, nov. 2021.

DARYABARI, H., LAI, H. R., SHIVAZAD, M., ONG, D. H., SOLEIMANI, A. F. (2016). Effect of strain, age, and shell color on quality traits of quail eggs. **Poultry Science**, 95(10), 2363-2371.

DUMAN, M.; SEKEROGLU, A. Effect of Egg Weights on Hatching Results, Broiler Performance and Some Stress Parameters. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 255-262, jun. 2017.

GULBAHAR, M.Y.; ERTUGRUL, M.; DINCER, E.; KARAKAYA, E.; GOKCE, G.; CALICIOGLU, M. Assessment of the role of avian infectious bronchitis virus infection in the aetiology of gout in broiler chickens. **The Journal of Poultry Science**, Seoul, v. 55, n. 2, p. 71-78, fev. 2018.

GUNTZEL, Régis Augusto. **Gravidade específica em ovos de matrizes pesadas**. 2015. 27f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

HEIER, B.T.; JARP, J. An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks. **Poultry Science**, Londres, v.80, n.8, p.1132-1138, abr. 2001.

HIPÓLITO, O.; SILVA, J.M.L.; HSIUNG, H.M. **Bronquite infecciosa das galinhas a doença no Brasil**. São Paulo, 1979. 72p.

HUTTON, P. Research on eggshell structure and quality. Na historial overview. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.7, n. 2, p. 67-71, apr. 2005.

KOO, J. Pathogenicity of Korean nephropathogenic infectious bronchitis virus (NIBV) isolate KOR/LH1204/11 in commercial layer chickens and efficacy of vaccination against the isolate. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 82, n. 8, p. 1118-1123, 2020.

Manual de Boas Práticas de Produção de Frangos de Corte 2020 - BRF – S.A. p.114, 146, 213, revisado em 2020.

MCCLELLAND, S.C.; JAMIE, G.A.; WATERS, K.; CALDAS, L.; SPOTTISWOODE, C.N.; PORTUGAL, S.J. Convergent evolution of reduced eggshell conductance in avian brood parasites. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 374, n. 1769, p. 1-12, fev. 2019.

MOHITI-ASLI, M.; GHANAATPARAST-RASHTI, M.; YEGANEHZAD, S.; ZAGHARI, M.; SHIVAZAD, M.; REZAEI, M. Effect of eggshell thickness on hatchability, chick quality, performance and blood biochemistry of broilers. **Poultry Science**, Londres, v. 97, n. 7, p. 2387-2393, set. 2018.

MURPHY, F.H.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary virology** 3.ed. New York: Academic Press, 1999. p.495-509.

Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS/OMS Saúde Pública Veterinária Centro Pan-Americano de Febre Aftosa, 2013. **Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras**.

PANAFTOSA Av. Presidente Kennedy, 7778 – CEP: 25040-004 Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

QUINTEROS, J.A.; NOORMOHAMMADI, A.H.; LEE, SW.; BROWNING, G.F.; DIAZ-MÉNDEZ, A. Genomics and pathogenesis of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 100, n. 10, p.496-512, ago. 2022.

RAMAKRISHNAN, S.; KAPPALA, D. Avian Infectious Bronchitis Virus. In: MALIK, Y.S.; SINGH, R.K.; YADAV, M.P. **Recent Advances in Animal Virology**. 1. ed. Izatnagar: Springer, 2019. p. 301-319.

ROSA, P. S.; ÁVILA, V. S. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Concórdia, v. 1, n. 246, p. 1-3, mai. 2000.

SILVA, C. S.; VEITES, F. M.; CASTRO, A. C. S.; MARTINS, L. Technological, Socioeconomic and Territorial Dynamics of Poultry Sector in Brazil. An Example of Efficient High Quality Protein Production. **Public Policy Portuguese Journal**, Évora, v. 6, n.3, p 37-45, fev. 2022.

5 INFLUÊNCIA DA DENSIDADE E QUALIDADE DA CASCA DOS OVOS FÉRTEIS SOBRE PARAMÊTROS PRODUTIVOS NO INCUBATÓRIO E MICROBIOTA INTESTINAL DE PINTOS DE

UM DIA

Alethéia Rotta Padilha^{1,4}, Maria Giovanna de Araújo Menezes³, Vanessa Peripolli^{1,3}, Teane
Milagres Augusto Gomes² Larissa Pickler⁴, Denize Maciel⁴, Fabiana Moreira^{1,3},

¹Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal (PPGPSA), Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, SC, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal (PPGPSA), Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, SC, Brasil.

³Núcleo de Ensino, Extensão e Pesquisa em Produção Animal (NEPPA), Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, SC, Brasil.

⁴Empresa BRF S/A, Capinzal, SC, Brasil.

5.1 Introdução

São inúmeros e constantes os desafios do segmento de produção de aves, devido à crescente demanda pelos produtos avícolas e as exigências dos mercados. Isto têm levado a uma intensa pressão em todos os setores da cadeia avícola, a fim de melhorar a taxa de crescimento, a eficiência alimentar e o *status* sanitário dos frangos (Silva, et al., 2022).

A qualidade da casca é um dos fatores de maior importância para o bom rendimento da incubação. A integridade da estrutura da casca dos ovos reflete na resistência e densidade, alterando a qualidade da casca para formar um ovo casca fina ou casca normal (McClelland et al., 2019).

A densidade da casca de ovos superior a 1.080, favorece os nascimentos de pintos viáveis (Heier et al., 2001). A espessura da casca dos ovos também evita a perda de água e possibilita trocas gasosas para o desenvolvimento do embrião (Attard; Portugal, 2021).

Fatores relacionados ao manejo dos ovos na granja também impactam na qualidade do ovo e, conseqüentemente, dos pintos, pois ovos postos no ninho tem menor carga microbiana do que ovos postos na cama, o que interfere na mortalidade embrionária e na eclosão. A cama dos aviários é um local contaminado por fezes das aves, com maior prevalência de *Escherichia coli*, impactando negativamente na qualidade dos ovos férteis e na viabilidade de pintos de um dia (Muniz, 2023). A qualidade da cama também influencia no estabelecimento da microbiota intestinal e pode impactar no desempenho dos frangos de corte (Cressman et al., 2010).

O incubatório possui a responsabilidade de disponibilizar pintos de qualidade, portanto é considerado uma das etapas mais importantes do processo avícola. A qualidade do pinto depende de alguns fatores, tais como estocagem dos ovos e manejo de incubadoras e nascedouros. É necessário que o incubatório receba ovos de qualidade, pois esses irão interferir nos resultados de taxa de eclosão e eclodibilidade (Poderoso, 2011).

Os incubatórios refletem a qualidade dos ovos recebidos, lotes de pintos de qualidade com ótimas condições sanitárias e imunológicas, homogêneos e com baixa mortalidade é o objetivo principal dessa etapa da avicultura industrial (Furlan, 2013).

Acreditava-se que as aves recém-eclodidas eram isentas de microrganismos, devido à dificuldade de cultivo pelos métodos tradicionais de bacteriologia. Porém, novas técnicas de Pedroso, (2011) de sequenciamento genômico de microbiota intestinal permitiu identificar a diversidade bacteriana do intestino, e entender as mudanças na flora intestinal.

Há uma diversidade de microrganismos no trato gastrointestinal das aves que interagem de forma negativa ou positiva na saúde da ave. A microbiota benéfica induz grande parte da resposta imunológica do organismo. Se ocorrer uma disbiose, os microrganismos maléficos se multiplicam, provocando lesões no epitélio intestinal, destruindo o equilíbrio da microbiota com o sistema imunológico. Manter a integridade do

epitélio intestinal é um dos principais fatores contribuintes para saúde da ave (Cruz et al., 2022).

As bactérias do trato gastrintestinal interagem entre si e com seus hospedeiros, e estas interações permanecem indefinidas devido à falta de conhecimento sobre a completa composição dessa microbiota, já que pode alterar profundamente a saúde e produtividade do animal em produção (Dehau et al., 2022).

Baseado neste contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da densidade e qualidade da casca os ovos férteis sobre parâmetros produtivos no incubatório e na microbiota intestinal de pintos de um dia.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Comitê de Ética

Os procedimentos realizados neste estudo foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal Catarinense (IFC) - Campus Araquari, aprovado sob o protocolo de número 429/2023.

5.2.2 Local e Animais

Granja de matrizes

A granja de matrizes possuía 42.000 matrizes, distribuídas em seis aviários. A nota média de auditorias de BPP foi de 95%. Quanto a biosseguridade, a granja possuía nota de 22 pontos, considerada granja de baixo risco sanitário.

O sistema era automatizados de coleta de ovos de ninho e a cama dos aviários foi constituída por maravalha de pinus, com altura de 10 cm. A ambiência dos aviários foi realizada com o sistema de pressão positiva, sendo utilizado a ventilação manual por meio de cortinas e climatização com o uso de ventiladores automáticos. As matrizes utilizadas

para este estudo eram da linhagem Ross Ap 95[®] com 52 semanas de idade e localizada no Meio Oeste Catarinense.

Incubatório de frango

O incubatório possuía área construída de 7.642 m², possuía 132 máquinas incubadoras de múltiplo estágio, sendo elas da marca (CASP M62[®], Brasil) e (PETERSIME VB504[®], Brasil). Possuía 66 nascedouros da marca (CASP G 21[®] e CASP 21RHE[®], Brasil). A capacidade de incubação de 11.206.000 ovos, com produção média de 9.245.000 pintinhos/mês.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos experimentais, em esquema fatorial 2x2 (Tab. 7).

As amostras de ovos dos quatro tratamentos foram identificadas como T1, T2, T3, T4, sendo 344 ovos para cada tratamento enviados para incubação totalizando 1.376 ovos com 10 repetições cada.

Tabela 7. Tratamentos do estudo de acordo com a densidade da casca e local de coleta dos ovos.

Tratamento	Densidade da casca dos ovos	Local de coleta	Quantidade de ovos
T1	Casca normal (= 1,080)	Ninho	344
T2	Casca normal (= 1,080)	Cama	344
T3	Casca fina (= 1,070)	Ninho	344
T4	Casca fina (= 1,070)	Cama	344

Para cada nascimento foram amostrados dez pintos por tratamento, logo após a eclosão, na sala de nascimento, totalizando 40 pintos amostrados e a quantidade total de pintos foi de 400, com dez repetições (Tab. 8).

Tabela 8. Tratamentos de acordo com local de coleta, densidade da casca dos ovos e número de pintos amostrados.

Tratamento	Densidade da casca dos ovos	Local de coleta	Número de pintos
T1	Casca normal (= 1,080)	Ninho	10
T2	Casca normal (= 1,080)	Cama	10
T3	Casca fina (= 1,070)	Ninho	10
T4	Casca fina (= 1,070)	Cama	10

Avaliações nas granjas de matrizes

Classificação dos ovos

Os ovos utilizados para o experimento foram coletados na segunda coleta do dia e separados em bandejas em duas categorias, conforme local de coleta, sendo proveniente de ninho e de cama. A desinfecção dos ovos foi realizada de forma separada entre as categorias, os ovos de ninho foram desinfetados antes.

O processo de desinfecção dos ovos utilizado foi com oxiclureto de cálcio 200 p.p.m. através do uso da Máquina de Desinfecção de Ovos (modelo FRMDO, Fornari®, Brasil).

As bandejas de incubação foram identificadas com etiquetas de acordo com o tratamento. Os ovos ficaram armazenados na sala de ovos da granja por 24 horas em temperatura ambiente controlada de 24°C e umidade relativa de 60%, foram transportados ao incubatório em temperatura controlada de 22°C e umidade relativa de 70%.

Avaliações no incubatório

Teste de gravidade específica da casca dos ovos

Os ovos ficaram estocados por dois pós postura das matrizes antes de iniciar o teste de gravidade específica (GE).

Aplicando a metodologia utilizada por Guntzel, (2015), para o teste de GE, foram categorizados como ovos com densidade de 1,070, sendo ovos de casca fina, e com densidade de 1,080 ovos de casca normal. A quantidade total de ovos utilizados para incubação foi 13.760 ovos, dos quatro tratamentos nas dez repetições.

Para realizar o teste de GE, os ovos foram separados por categoria entre ovos coletados no ninho e os ovos coletados na cama. Durante o teste os ovos de ninho foram avaliados primeiro, após encontrado o número de 344 ovos para compor o T1 e T3, foi realizado o teste nos ovos para compor o T2 e T4.

Foram utilizados quatro baldes com diferentes níveis de sal e água clorada. Cada balde representava cada categoria de densidade específica da casca do ovo. Os quatro baldes foram identificadas com quatro categoria de densidade, sendo elas de 1,065, 1,070, 1,075 e 1,080.

Para corrigir solução de salina obtida, foi utilizado o auxílio de densímetro de massa específica (modelo 1000 a 1.100/250 ml, Incoterm®, EUA). Quando a densidade apresentava valor abaixo do identificado em cada categoria foi adicionado pequena quantidade de sal, e quando estava acima de cada categoria, foi adicionado água clorada. A cada 1.032 ovos passados na solução de 1,065, todas as soluções eram aferidas e corrigidas para a densidade específica identificada em cada balde. O objetivo dessa atividade foi manter a densidade das soluções conforme o especificado para cada tratamento.

Caso as densidades apresentem valores abaixo do especificado, adicionar pequena quantidade de sal, caso esteja acima, adicionar água. O ovo que flutua confere a densidade específica contida na solução de salina da bacia, e o ovo que encosta no fundo da bacia, deverão ser mergulhados na posterior bacia com densidade superior, conforme metodologia descrita por (Guntzel, 2015).

Os ovos com densidade $\leq 1,065$ e ovos com densidade maior que 1,080 não foram utilizados para o experimento. Os ovos que flutuavam no balde de densidade de 1,070 foram destinados para bandejas de incubação identificados como casca fina, correspondendo aos tratamentos T3 e T4. Os ovos com densidade específica igual a 1,080 foram destinados para bandejas de incubação identificados como casca normal.

Após determinar a densidade de cada ovo, estes foram alocados em bandejas de incubação, com limite de 86 ovos por bandeja. As bandejas foram identificadas por

tratamento e direcionadas para a sala de ovos, armazenados em temperatura controlada de 20°C, umidade relativa de 65%.

Incubação dos ovos

O processo de incubação artificial para os quatro tratamentos foi submetido às mesmas condições de tempo de estoque e máquina de incubação. Seis horas antes da incubação, os ovos foram enviados para sala de incubação, com temperatura de 26°C e umidade relativa de 55%.

Os carrinhos ficaram alocados em frente a máquina de incubação por seis horas, passando pelo processo de pré-aquecimento. Após o pré-aquecimento os carrinhos foram colocados em incubadora de múltiplo estágio (CASP M62®, Brasil).

A temperatura do ar dentro da incubadora foi de 37,5°C e a umidade relativa para a incubação foi de 60% durante 24 horas. Os ovos eram virados automaticamente a 45°C a cada hora e aos 19 dias de incubação foram vacinados *in ovo* com a vacina (Vaxxitek®) para doenças de Marek, Bouba e Gumboro, através da vacinadora (Embrex Inc. NO IOM.007, EUA) e, então, transferidos para o nascedouro (CASP G21®, Brasil).

Nascimento dos pintos

Os ovos dos quatro tratamentos foram enviados para o mesmo nascedouro e, durante os três dias, ficando mantidos a uma temperatura de 36,6°C e umidade relativa de 85%.

Durante os três dias do nascedouro, os ovos foram nebulizados com uma solução de desinfetante ácido peracético a 450 ppm, utilizando 45 mL de solução para cada aspersão para um nascedouro. As desinfecções ocorreram a cada 30 minutos e iniciaram no primeiro momento da transferência até o nascimento dos pintos. Após o prazo de 21 dias de incubação artificial, foi contabilizada a eclosão e a eclodibilidade de cada tratamento, separando os pintos de primeira e demais resíduos para realização do embriodiagnóstico, para análise de dados de cada tratamento.

Embriodiagnóstico e avaliação dos parâmetros zootécnicos

O embriodiagnóstico foi realizado com base no Manual de Dicas de Incubação da Aviagen®, (2010), sendo avaliado as fases de mortalidade embrionária de cada tratamento e quantificar a taxa de eclosão, de eclodibilidade e de mortalidade dos embriões provenientes dos ovos casca normal e ovos de casca fina da granja positiva e da granja negativa para o vírus de BIG. Os ovos foram quebrados pela câmara de ar, separando os ovos não eclodidos, identificando e registrando os dados, sempre pelo mesmo operador. O estágio de desenvolvimento do embrião de cada amostra foi separado e identificado, classificando-os em grupos usando como referência (Tab. 9).

Tabela 9. Classificação de mortalidade embrionária por fase de acordo com o exame de embriodiagnóstico.

Dias de incubação	Classificação	Observação
0	Infértil	Nenhum sinal evidente de embrião
1	Morte Precoce	Membranas extraembrionárias de cor creme, ocupando uma área de até 1 cm de diâmetro
2	Morte Precoce	Membranas extraembrionárias de cor creme, ocupando uma área de até 3 cm de diâmetro
2,5 – 4	Anel de Sangue	Anel de sangue evidente e o começo da formação do fluido embrionário
5 – 12	Olho Preto	Pigmentação preta do olho do embrião é evidente, as asas e as pernas podem ser vistas também
13 – 17	Penas	Existem penas. Embora as primeiras penas sejam vistas já aos 11 dias.
18 – 19	Virado	O embrião está se mexendo da posição cabeça entre as pernas, para a posição de eclosão e a gema permanece fora do corpo do embrião
20	Bicado vivo e bicado morto	O bico do embrião quebrou a casca e não conseguiu eclodir. Se encontrado vivo, bicado vivo. Se morto, bicado morto

1 – 21	Contaminação bacteriana	Forte descoloração do conteúdo do ovo com emissão de maus odores
1 – 21	Contaminação fúngica	Colônias de fungos aparentes na câmara de ar dos ovos

Fonte: Aviagen, (2010).

Foi identificada as fases de mortalidade embrionária bem como retirado e contabilizado todos os pintos mortos por bandeja, sendo um número total de 344 ovos incubados por tratamento.

Para a obtenção do percentual de eclosão foi realizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de eclosão} = \frac{\text{Pintos Nascidos}}{\text{Ovos Incubados}} * 100$$

A taxa de eclosão foi obtida utilizando o número de pintos nascidos de cada tratamento, dividido por 344 ovos férteis e multiplicado por 100.

Para obtenção do percentual de eclodibilidade foi realizada a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de Eclodibilidade} = \frac{\text{Ovos incubáveis} - \text{Ovos Inférteis}}{\text{O . Férteis}} * 100$$

A taxa de eclodibilidade foi obtida após diminuído o percentual de ovos inférteis encontrados.

Coleta de conteúdo intestinal de pintos

As coletas foram realizadas logo após a eclosão, dentro da sala de nascimento, com temperatura controlada de 25°C e umidade relativa de 55%. Foram quatro tratamentos e dez repetições, em cada nascimento foram enviados dois *pools* (n= 10 pintos) de conteúdo para análise. No total foram dez nascimentos/repetições, em cada nascimento 40 pintinhos amostrados, totalizando 400 pintinhos para 13.760 ovos incubados.

Para realizar a coleta de conteúdo intestinal, os pintos foram sacrificados através do método de deslocamento cervical, seguido de exsanguinação com tesoura, logo após o abdômen foi exposto em decúbito dorsal para retirada de todo o sistema digestório.

Foi realizada a dissecação do intestino de cada pinto com o auxílio de tesoura, realizando um corte na parte apical do intestino (junção com a moela) e outro corte na parte

final do intestino (junção com a cloaca). Quatro porções do intestino foram utilizados para compor o *pool* de amostra de conteúdo intestinal de cada pinto: o intestino grosso, cecos, intestino delgado e alça duodenal, excluindo o pâncreas.

Com auxílio de uma pinça foi retirado o conteúdo intestinal (cerca de 2 a 2,5 ml) de cada pinto e direcionado em placa de Petri, de forma separada, até formar dez porções, ou conteúdo de dez pintos, conforme Figura 4.



Figura 4. Coleta de conteúdo intestinal de pintos.

Concluída a extração, o conteúdo de *pool* de cinco pintos foi acondicionado em tubo de *ependorf* contendo *RNAlater*, sendo que uma amostra ou *ependorf* foi formada pelo *pool* de conteúdo de cinco pintos.

Logo após a coleta, as amostras em *Ralaste* foram congeladas em temperatura controlada de 20°C negativos. Posteriormente, foram transportadas em temperatura controlada de 20°C negativos para o laboratório de sequenciamento de microbiota, localizado na Áustria – EK.

Sequenciamento da microbiota

As análises de sequenciamento de microbiota das amostras de conteúdo intestinal, foram realizadas no Laboratório BIOMIN/DSM®, localizado em Tulln, Áustria.

Para a realização das 80 amostras, foram utilizadas as técnicas de isolamento de DNA usando *kit Power Fecal Pro DNA* da QIAGEN®; preparação de DNA para sequenciamento, utilizando o *kit* de ligação nativa da Oxford Nanopore Technologies (ONT).

Para o sequenciamento do DNA, foi preparado com os sequenciadores nanopore, executando o sequenciamento por 72 horas. A análise de dados foi validada, automatizada e padronizada com *pipeline* de bioinformática para taxonomia, os dados serão foram descritos em porcentagem. Os dados brutos de sequenciamento foram acrescentados no pipeline e gerado a tabela de contagem, usado para realizar a as análises estatísticas, conforme ilustra a Figura 5.

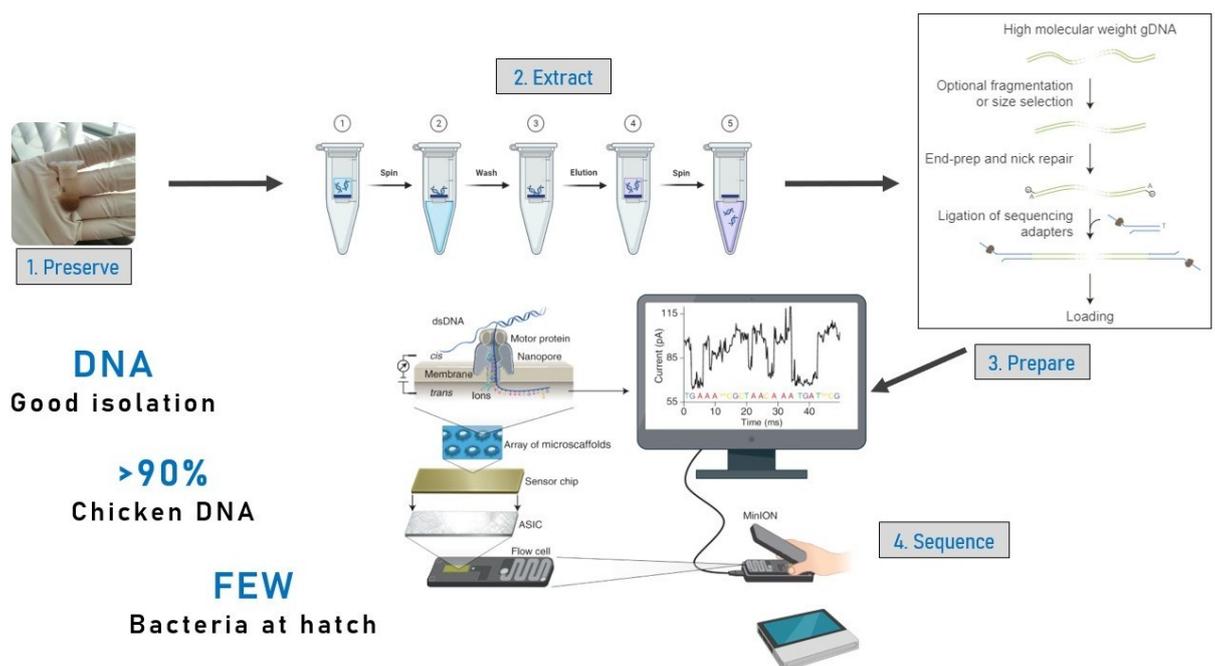


Figura 5. Fluxograma da análise de sequenciamento de microbiota

Fonte: Grenier, B., DSM-firmenich, DSM Áustria (2023).

5.2.3 Análise estatística

A análise foi realizada com os dados de desempenho dos ovos e embriões no incubatório e testados quanto à normalidade da distribuição e homogeneidade dos resíduos através dos testes de Shapiro Wilk. Dados paramétricos foram analisados através do procedimento MIXED em um modelo que incluiu a densidade da casca do ovo e o vírus de BIG como efeito fixo. O efeito aleatório de bandeja foi considerado para os dados de incubatório.

Interações entre a densidade da casca do ovo e vírus de BIG foram testadas. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey. Usando o critério de informação de Akaike, a estrutura de componentes da variância (VC) foi considerada como o melhor modelo para a estrutura de covariância residual.

Os dados não paramétricos foram analisados através do procedimento NPAR1WAY (Kruskal Wallis) e as médias foram comparadas pelo método DSCF (Dwass-Steel-Critchlow-Fligner). As análises foram realizadas no programa *Statistical Analysis System* (SAS Inst. Inc., Cary, NC, versão 9,4), e diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

Para os dados de sequenciamento de microbiota intestinal, para avaliar os efeitos dos tratamentos na composição da microbiota, os dados foram avaliados em modelo misto para medidas repetidas, levando em consideração os diferentes nascimentos (GraphPad Software, Inc.). Além disso, foi feita uma análise *two-way* ANOVA bidirecional para avaliar a interação entre as salas de nascimento e sala de expedição conforme os tratamentos.

5.3 Resultados

Avaliações no incubatório

Análise de desempenho

Os dados produtivos no incubatório não demonstraram efeito da interação na taxa de eclosão e de eclodibilidade entre os tratamentos, ou seja, a densidade da casca de ovo não foi relacionada ao local de postura ($P>0,05$) (Tab. 8).

A densidade da casca dos ovos não influenciou os índices de mortalidade intermediária, mortalidade final, bicados mortos e taxa de pintos descarte ($P>0,05$). Os ovos de casca fina apresentaram taxa de ovos inférteis semelhante aos ovos de casca normal ($P>0,05$). No entanto, ovos de casca fina obtiveram maior taxa de mortalidade intermediária e final que ovos de casca normal ($P>0,05$).

Ao comparar os ovos provenientes de ninho e de cama, a taxa de eclosão e de eclodibilidade foi maior para os ovos postos no ninho do que os ovos postos na cama ($P>0,05$). A taxa de ovos inférteis foi superior nos ovos postos em cama em relação aos ovos postos no ninho ($P<0,05$).

A taxa de contaminação bacteriana e a taxa de bicados mortos, foi maior em ovos postos na cama que para os ovos postos no ninho ($P<0,05$). Não foi observada diferença entre os ovos postos no ninho e na cama sobre os parâmetros de ovos inférteis, contaminação fúngica e bicado vivo ($P>0,05$).

Tabela 10. Efeito da densidade da casca do ovo e o local de postura dos ovos, sobre os parâmetros zootécnicos de incubatório.

Parâmetro	Casca do Ovo		Local de Postura		Mean	EPM	Pr>F		
	Normal	Fina	Ninho	Cama			Casca	Postura	Casca × Postura
Taxa de Eclosão, %	61,89	59,71	71,30 ^a	50,16 ^b	60,93	1,2602	0,2159	<0,0001	0,1917
Taxa de Eclodibilidade, %	67,88	65,98	77,61 ^a	56,25 ^b	67,14	1,2657	0,3116	<0,0001	0,1927
Pintos descarte, %	3,21	3,63	3,25	3,60	3,42	0,2596	0,4062	0,2067	-
Ovos inférteis, %	9,33	10,20	8,12 ^b	11,41 ^a	9,74	0,3896	0,2380	<0,0001	0,9702
Mort. Inicial %	6,93	5,71	2,39 ^b	10,37 ^a	6,31	0,5114	0,7655	<0,0001	-
Contaminação Bacteriana, %	4,24	4,46	2,48 ^b	6,29 ^a	4,35	0,3638	0,9647	<0,0001	-
Mort. Intermediária, %	2,32 ^b	2,87 ^a	1,61 ^b	3,63 ^a	2,60	0,1821	0,0452	<0,0001	-
Contaminação Fúngica, %	0,36	0,58	0,43	0,51	0,47	0,0897	0,8257	0,7582	-
Mort. Final, %	2,47 ^b	4,01 ^a	2,51 ^b	4,03 ^a	3,25	0,2215	0,0011	<0,0001	-
Bicado vivo*, %	0,93	0,98	0,90	1,02	0,96	0,1235	0,5868	0,2216	-
Bicado morto**, %	0,22	0,46	0,18 ^b	0,51 ^a	0,34	0,0570	0,0677	0,0050	-

Pr>F: probabilidade, EPM: erro padrão da média, letras minúsculas diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey ou DSCF a 5% (P<0,05). Bicado vivo: Ovo bicado com embrião vivo **Bicado morto: ovo bicado com o embrião morto.

Análise da microbiota intestinal dos pintos

Na análise de sequenciamento da microbiota intestinal foram identificadas bactérias do gênero *Clostridium sp*, *Enterococcus sp*, *Escherichia sp*, *Klebsiela sp* e *Salmonella sp*. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos na composição da microbiota intestinal ($P>0,05$).

Em todos os tratamentos o gênero mais identificado e em maior porcentagem foi o *Clostridium sp* com a porcentagem de 41,1% no T1 seguido do T4 com 39,2%. O tratamento com a terceira maior porcentagem observou-se no T3, apresentando 36,9%. O T2 apresentou a menor porcentagem de *Clostridium sp*, de 34% conforme demonstra a Figura 6.

O segundo gênero identificado em maior porcentagem da composição total de bactérias identificadas foi o *Enterococcus sp*. O T2 apresentou a maior porcentagem 35,3%, seguido do T3 com a porcentagem de 31,4%, seguido do T4 com 25%, a menor porcentagem foi observada no (23%), como demonstra a Figura 6.

O gênero *Escherichia sp*, foi o terceiro gênero mais identificado. No T1 observou-se 35,3%, no T2 32,5%, no T3 32,2% e para o T4 35,2%. Os gêneros *Klebsiella sp* e *Salmonella sp* foram encontrados em porcentagem pouco relevante, como demonstra a Figura 6.

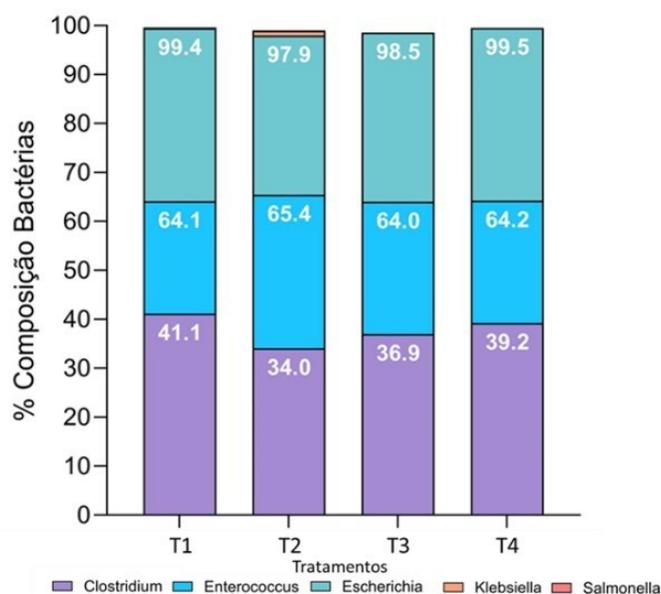


Figura 6. Principais gêneros isolados no conteúdo intestinal dos pintos em cada tratamento.

Fonte: Grenier, B., DSM-firmenich, DSM Áustria (2023).

Nos resultados desse estudo, observou-se a composição de bactérias no nível de gênero, dos quatro tratamentos, não foram observadas diferenças significativas na composição da microbiota intestinal dos pintos eclodidos após a eclosão ($P > 0,05$).

Nesse estudo a principal espécie de *Clostridium sp* detectada em todas as amostras foi *Clostridium saudiense* (35,9% em média). Também foi observado que o gênero *Enterococcus sp*, em todos os tratamentos, foi possível identificar a porcentagem das espécies: *E. faecalis*: 24.2%, *E. faecium*: 1.97%, *E. cecorum*: 0.02%. Não foi observado efeito da interação entre os quatro tratamentos para nenhuma espécie de *Enterococcus sp* da microbiota dos pintos eclodidos.

5.4 Discussão

Este estudo mostrou que a densidade da casca do ovo e local de postura dos ovos pelas matrizes podem afetar o desempenho dos embriões, apesar de não influenciar a microbiota dos pintos de um dia, de forma independente para a maioria das variáveis analisadas.

A avaliação de gravidade específica é uma técnica importante para determinar a densidade do ovo, pois gera uma resposta direta em relação à espessura da casca (Arslan; Yamak, (2020). Neste estudo os ovos considerados de casca normal apresentaram uma densidade igual a 1,080, o que de acordo com Arslan; Yamak, (2020), são aqueles que apresentam os melhores resultados, uma vez que ovos contendo densidades \leq a 1,075 terão casca mais fina, e, portanto, maior perda de umidade e redução na taxa de eclosão.

Dessa forma, a densidade da casca pode influenciar a capacidade do ovo de resistir à colonização bacteriana e fúngica e por agir como barreira evitando a contaminação ao embrião. Portanto, isto sugere que ovos de casca normal estão associados a uma menor mortalidade e menor probabilidade de contaminação bacteriana ou fúngica, uma vez que os ovos de casca íntegra, estão menos sujeitos a contaminação microbiana (Rosa; Avila, 2000).

A densidade da casca dos ovos também pode ser um fator que influencia a contaminação dos ovos, pois ovos com densidade \leq a 1,070 estão relacionados ao aumento de porosidade da casca, e, portanto, maior facilidade de contaminação microbiana por fragilidade da barreira natural de proteção do embrião (Rosa; Avila, 2000).

A idade da matriz é um fator que influencia a qualidade da casca dos ovos, pois matrizes com idade superior a 56 semanas, produzem uma proporção maior de ovos com cascas de densidade \leq a 1,070, refletindo em piora dos índices de eclosão (Rosa; Avila, 2000). Porém, neste estudo não foi avaliada matrizes com diferentes idades em relação a densidade da casca, no entanto o grupo do estudo envolveu matrizes no final da vida produtiva com 60 semanas, ou seja, que poderiam apresentar maiores chances de produzirem ovos de casca fina.

Nesse estudo, sobre os dados de desempenho de incubatório, foi observado que a densidade da casca do ovo impactou nos parâmetros avaliados do incubatório, apresentando resultados inferiores para ovos de casca fina. Estes dados estão de acordo com estudos apresentados por Bölükbaşı et al., (2008), que registraram ovos com casca fina apresentando maior incidência de mortalidade embrionária, menor peso ao nascimento dos pintos e maior mortalidade pós-nascimento em comparação com ovos de casca normal.

Tendo em vista que ovos de casca fina apresentaram maior taxa de contaminação fúngica e bacteriana, Daryabari et al., (2016) descreveram que ovos de casca fina que apresentam maior incidência de contaminação por bactérias e fungos, podem apresentar redução na qualidade dos pintos produzidos e maior taxa de mortalidade.

Neste estudo as taxas de mortalidade inicial e intermediária foram superiores nos ovos de casca fina em comparação aos ovos de casca normal, dessa forma, entende-se que o embrião se encontra mais vulnerável a lesões e infecções pela menor proteção fornecida pela casca mais fina. Para Barbosa et al., (2008) durante o processo de incubação a casca do ovo desempenha um papel fundamental por proteger o embrião contra a invasão microbiana, controlar a troca de água e gases através dos poros e fornecer cálcio essencial para o desenvolvimento do embrião.

No presente estudo, ovos postos na cama apresentaram redução nas taxas de eclosão e eclodibilidade. Esses achados corroboram com o estudo conduzidos por Souza et al., (2021), fortalecendo a importância da postura dos ovos nos ninhos sobre a qualidade. Ninhos em número suficientes e com condução elétrica ajustada para evitar choque nas matrizes, as direciona buscarem o ninho para realizarem a postura, diminuindo o percentual de ovos de cama, garantindo uma maior taxa de eclosão e uma mortalidade embrionária menor.

A eclosão dos pintos oriundos de ovos postos na cama pode ser menor em relação aos ovos postos no ninho devido a uma maior porcentagem de bactérias na casca e no conteúdo dos ovos de cama (Van Den Brand et al., 2016). Estudos conduzidos por Li et al., (2022); Zhou et al., (2020) e Vekic et al., (2021), também identificaram que a incubação de ovos postos na cama esteve associada a piores resultados de taxa de eclosão e eclodibilidade. A taxa de eclodibilidade é influenciada por maior mortalidade embrionária devido contaminação de bactérias.

Os ovos postos em ninho apresentaram menor taxa de ovos inférteis, mortalidade inicial, intermediária e final, contaminação bacteriana e bicado morto comparados com os ovos postos na cama, uma vez que ovos postos na cama apresentam maior contaminação devido à alta carga bacteriana decorrente do contato direto com as fezes das aves (Souza et al., 2021).

Os resultados do presente estudo sobre a composição da microbiota revelaram que não houve diferença entre os pintos de um dia oriundos de ovos de casca normal ou de casca fina e o local de postura dos ovos, corroborando com o estudo de Oakley; Kogut, (2016) que indicaram a abundância de microrganismos no TGI sendo significativa somente na terceira semana quando comparada a primeira semana de vida dos frangos.

O estudo de Maiorka, et al., (2006), conclui que o TGI do pinto ao nascer é praticamente isento de microrganismos e que o intestino delgado é colonizado na segunda semana de vida. Dessa forma, como as coletas de conteúdo intestinal deste estudo foram realizadas no dia da eclosão dos pintos, uma diferença não foi observada, no entanto como

poderia ter ocorrido caso a coleta tivesse sido realizada semanas após o alojamento dos frangos, tanto relacionado a densidade dos ovos como local de postura.

Na avicultura industrial, os pintos eclodem em incubatório, ambiente o qual há pouco contato com microrganismos devido as rotinas de higienização, apresentando grande diferença na quantidade de variedade de microrganismos que a forma de nascimento natural, portanto pelo presente estudo, percebe-se que no primeiro dia de vida há composição da microbiota é semelhante independentemente da qualidade da casca dos ovos.

No presente estudo não foi observada diferença entre a composição de microbiota das aves independente do tratamento, corroborando com o estudo realizado por Lunedo, (2012), que observou que há baixa diversidade da composição de microbiota no primeiro dia de vida das aves se dá primeiramente pelos ovos férteis serem oriundos da mesma granja de matrizes, criadas sob as mesmas condições sanitárias, dietéticas e ambientais.

As comunidades microbianas intestinais para os frangos apresentam um prazo curto de maturidade e sendo assim, a microbiota destas aves se estabiliza logo após o terceiro dia de vida (Apajalahti et al., 2004).

Segundo estudo conduzido por Oakley et al., (2014) a diversidade da microbiota intestinal das aves, aumenta significativamente ao longo do seu crescimento. Nesse mesmo estudo, comparou a composição da microbiota intestinal de frangos com 0 e 42 dias de vida, evidenciando que a composição duplica quando o frango está com 42 dias de vida.

Ao encontro com o estudo conduzidos por Martin; McCann, (1998) relata que a cama dos aviários, possui grande quantidade de fezes e conseqüentemente microrganismos, como *Enterococcus* sp. e *Clostridium* sp. que podem agravar a contaminação bacteriana no momento da incubação e influenciar na composição da microbiota intestinal de aves.

O processo de formação da microbiota intestinal das aves ainda não está bem esclarecido. As fezes e os ovos passam pelo mesmo canal para ser expelido do corpo das fêmeas, denominado de cloaca, que pode resultar na transmissão da microbiota da cloaca para o oviduto e para a cavidade abdominal acarretando início da colonização do ovo em formação e posteriormente o desenvolvimento do embrião (Stanley et al. 2014).

O presente estudo demonstrou que o segundo grupo com maior porcentagem isolado foi *Enterococcus*, corroborando com estudo conduzido por Lunedo, (2012) mostrando que o perfil de bactérias da microbiota intestinal ao nascimento das aves é consideravelmente alto, composto principalmente por cepas do gênero *Enterococcus spp* e observando a ausência nas aves ao nascimento do grupo *Lactobacillus*, corroborando novamente com o presente estudo, onde não foram isoladas bactérias desse mesmo grupo.

5.5 Conclusão

O local de coleta dos ovos influenciou o desempenho dos pintos no incubatório. Os ovos postos no ninho apresentam melhor taxa de eclosão e de eclodibilidade, além de menores percentuais de ovos inférteis, contaminação bacteriana e ovo bicado morto em relação aos ovos postos na cama.

A composição da microbiota dos pintos eclodidos, após a eclosão e na sala de expedição foi semelhante, independente da densidade da casca e local de postura dos ovos.

6 REFERÊNCIAS

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A.; GRAHAM, H. Características das Comunidades Microbianas Gastrointestinais, com Referência Especial ao Frango. *Poult do Mundo. Ciência*. J.2004,60, 223–232.

ARSLAN, A.; YAMAK, U. Comparison of different eggshell thickness measurement methods. *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, Ankara, v. 44, n. 5, p. 1150-1153, out. 2020.

ATTARD, M.R.G.; PORTUGAL, S.T. Climate variability and parente nesting strategies influence gas Exchange across avian eggshells. *Proceedings. Biological Sciences*, Londres, v. 288, n. 1953, p. 1-9, jun. 2021.

Aviagen. **Como Investigar as Práticas de Incubação**. Qualidade de Rotina no incubatório. 2010. Disponível em: http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Ovoincubavel.pdf>. Acessado em: 24 jun. 2023.

BARBOSA, V.M.; CANÇADO, F.V.; BAIÃO, N.C.; LANA, A.M.Q.; LARA, L.J.C.; SOUZA, M.R. Efeitos da umidade relativa do ar na incubadora e da idade da matriz leve sobre o rendimento da incubação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 60, n.3, p.741-748, jun. 2008.

BÖLÜKBAŞI, S. C.; ÇELİK, L.; ÖZKAN, S.; YILDIZ, A. Effects of eggshell quality and broiler breeder age on hatching results. *The Journal of Applied Poultry Research*, Atenas, v. 17, n. 1, p. 95-102, 2008.

CRESSMAN, M.D., YU, Z., NELSON, M. C., MOELLER, S. J., LILBURN, M. S., ZERBY, H. N. Interrelations between the Microbiotas in the Litter and in the Intestines of Commercial Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, Columbus, v. 76, n. 19, p. 6572–6582, out. 2010.

CRUZ, L. C. F.; COSTA, T. F.; SAMPAIO, S. A.; DIAS DA SILVA, N. G.; ABREU, J. M. de; BORGES, K. F.; SALES, G. M.; ALEXANDRINO, S. L. de S. A.; SANTOS, F. R. dos; MINAFRA, C. S. Intestinal microbiome of birds and its importance. *Research, Society and Development*, Itabira, v. 11, n. 2, jan. 2022.

- DARYABARI, H., LAI, H. R., SHIVAZAD, M., ONG, D. H., SOLEIMANI, A. F. (2016). Effect of strain, age, and shell color on quality traits of quail eggs. **Poultry Science**, 95(10), 2363-2371.
- DEHAU, T.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F.; GOOSSENS, E. Omics technologies in poultry health and productivity - part 1: current use in poultry research. **Avian Pathology**, Houghton, v. 51, n. 5, p. 407-417, out. 2022.
- FIORE E.; VAN TYNE D.; GILMORE M. 2019. Pathogenicity of Enterococci. **Microbiologic Spectrum** 7. Department of Microbiology, Harvard Medical School, Boston. Jul.2019.
- FURLAN, J.J.M. *Avaliação do manejo pré-incubação*. 2013. Dissertação Mestrado – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- GUNTZEL, Régis Augusto. **Gravidade específica em ovos de matrizes pesadas**. 2015. 27f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Departamento Acadêmico de Ciências Agrárias, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.
- HEIER, B.T.; JARP, J. An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks. **Poultry Science**, Londres, v.80, n.8, p.1132-1138, abr. 2001.
- LI, M.; MENG, J.; WANG, W.; HE, M.; ZHAO, Z.; MA, N.; LV, Q.; QIN, Y.; GENG, H.; ZHAO, Q. Dynamic description of temporal changes of gut microbiota in broilers. **Poultry Science**, v. 101, n. 9, p. 102037, set. 2022. Elsevier BV.
- LUNEDO, R. **Avaliação da microbiota presente na mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com ração a base de milho ou sorgo através de PCR em Tempo Real**. Dissertação – (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita), Jaboticabal, 2012.
- MARTIN, S. A.; McCANN, M. A. 1998. **Microbiological survey of Georgia poultry litter**. J. Appl. Poult. Res. 7:90-98.
- MCCLELLAND, S.C.; JAMIE, G.A.; WATERS, K.; CALDAS, L.; SPOTTISWOODE, C.N.; PORTUGAL, S.J. Convergent evolution of reduced eggshell conductance in avian brood parasites. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, Londres, v. 374, n. 1769, p. 1-12, fev. 2019.
- MUNIZ, E. **Escherichia coli: cuidados essenciais com o manejo dos ovos de ninho e cama**. 2023. Disponível em: <<https://www.zoetis.com.br/paineldaavicultura/posts/156-escherichia-coli-cuidados-essenciais-com-o-manejo-dos-ovos.aspx/>> Acesso em: 16 nov. 2023.

OAKLEY, B.B., BUHR, R.J., RITZ, C.W., KIEPPER, B.H., BERRANG, M.E., SEAL, B.S. & Cox, N.A. (2014). Successional changes in the chicken cecal microbiome during 42 days of growth are independent of organic acid feed additives. **Veterinary Research**, 10: 282.

OAKLEY, B.B.; KOGUT, M.H. Spatial and Temporal Changes in the Broiler Chicken Cecal and Fecal Microbiomes and Correlations of Bacterial Taxa with Cytokine Gene Expression. **Front. Vet. Sci.** 3:11. doi: 10.3389/fvets.2016.00011.

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

PODEROSO, F. M. G. L. Impacto do ambiente do incubatório na produção de pintos de corte. 2011. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Agrícola. Campinas, 2011.

ROSA, P. S.; ÁVILA, V. S. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Concórdia, v. 1, n. 246, p. 1-3, mai. 2000.

SILVA, C. S; VEITES, F. M.; CASTRO, A. C. S.; MARTINS, L. Technological, Socioeconomic and Territorial Dynamics of Poultry Sector in Brazil. An Example of Efficient High Quality Protein Production. **Public Policy Portuguese Journal**, Évora, v. 6, n.3, p 37-45, fev. 2022.

SOUZA, C. S; VEITES, F. M.; CASTRO, A. C. S.; MARTINS, L. Technological, Socioeconomic and Territorial Dynamics of Poultry Sector in Brazil. An Example of Efficient High Quality Protein Production. **Public Policy Portuguese Journal**, v. 6, n.3, p 37-45, 2021.

STANLEY, D.; HUGHES, R.J.; MOORE, R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 10, p. 4301–4310, mai. 2014.

VAN DEN BRAND, H.; SOSEF, M.P; LOURENS, A; VAN HARN, J. Effects of floor eggs on hatchability and later life performance in broiler chickens. **Poultry Science**, Londres, v. 95, n.5, p. 1025-1032, mai. 2016.

VEKIC, M.; BIJELONIC, B.; PÉRIC, L.; SAVIC, D.; JOTANOVIC, S.; MITRAKOVIC, M. Effect of nest and floor eggs with visually clean shells on hatchability and chick quality in broiler breeders. **Agro-knowledge Journal**, Banja Luka, v. 22, n. 3, p. 77-85, nov. 2021.

ZHOU, Q.; HU, Z.; DU, L.; LIU, F.; YUAN, K. Inhibition of *Enterococcus faecalis* Growth and Cell Membrane Integrity by *Perilla frutescens* Essential Oil. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 17, n. 9, p. 547–554, mar. 2020.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a espessura da casca do ovo e a presença do vírus de BIG têm efeitos significativos na qualidade dos ovos, na taxa de eclosão, na saúde e no desempenho dos pintos.

Diante desses resultados, a adoção de medidas de biossegurança, como a higienização adequada dos equipamentos e instalações, uso de vacinas e controle da movimentação de aves, é essencial para prevenir a disseminação do vírus de BIG e garantir a qualidade dos ovos e dos pintos. Além disso, a seleção de ovos com casca normal para incubação pode ser uma estratégia eficaz para melhorar a taxa de eclosão, a saúde e o desempenho dos pintos.

Por fim, este estudo contribuiu para a compreensão dos fatores que afetam a qualidade dos ovos e a saúde dos pintos em sistemas de produção avícola. Espera-se que esses resultados possam ser utilizados para orientar a adoção de práticas mais eficazes de manejo e controle de doenças, visando a melhoria da produtividade e a redução de perdas na produção avícola, e que ele também consiga melhor embasar decisões de incubação de ovos e a sua qualidade de casca, em momentos estratégicos, como, por exemplo quando ocorre baixa ou alta oferta de proteína de frango.

As conclusões extraídas dos resultados deste estudo são de grande importância para a área de incubação de ovos, oferecendo *insights* cruciais sobre fatores que impactam diretamente a produtividade e qualidade dos ovos em questão. Tais descobertas podem ter implicações práticas significativas para a indústria avícola, gerando oportunidades de aprimoramento em suas práticas.

Um posto-chave observado é a notável influência do local de coleta dos ovos para o processo de incubação. Foi identificada uma diferença significativa entre os ovos postos no ninho e aqueles postos na cama em termos de taxa de eclosão, eclodibilidade, taxa de ovos inférteis, taxa de contaminação bacteriana e taxa de bicados mortos. Essa diferença reforça a importância de estratégias que favoreçam a postura de ovos das matrizes pesadas nos ninhos, sugerindo que essa prática pode melhorar substancialmente a eficiência dos incubatórios.

Os resultados deste estudo abrem espaço para investigações futuras, sugerindo a relevância de estudos mais aprofundados sobre os fatores que contribuem para a tendência de bicado morto em ovos de casca fina e o desenvolvimento de estratégias para minimizar esse problema. Além disso, é interessante explorar as condições ideais de incubação que otimizam a qualidade dos ovos postos na cama, pois essa é uma área que pode beneficiar os produtores e incubatórios.

Em termos práticos, os achados deste estudo têm implicações diretas para a indústria avícola, fornecendo informações valiosas para aprimorar as práticas de manejo em granjas de matrizes pesadas e incubatórios. Isso inclui a consideração da escolha da densidade da casca dos ovos férteis, bem como da escolha para incubação de ovos oriundos de aves com postura no ninho ou na cama, visando melhorar a eficiência e a qualidade da produção de pintos.

As alterações na microbiota que não foram observadas nas amostras de conteúdo intestinal de pintos, talvez tenham sido relacionados aos fatores de casca de ovo, local de postura dos ovos, o momento da coleta das amostras de conteúdo intestinal. É possível que esses fatores, seja refletido ao longo da vida do frango. Outros experimentos com coletas ao longo da vida dos frangos podem ser realizados, para de fato observar se existe interação entre a casca do ovo, influência da BIG na microbiota intestinal, no desempenho zootécnicos.

Talvez no primeiro dia de vida da ave, não seja possível ver alterações mais significativas e que talvez essas alterações sejam mais visíveis ao longo da vida da ave.

Novas pesquisas são cruciais para o melhor entendimento como essas alterações podem acarretar o desenvolvimento da microbiota intestinal das aves e em desempenho das aves.

8 REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2022. Disponível em: <https://www.abpa-br.org/abpa-relatorio-anual/>. Acesso em: 07 nov. 2023.

AITCHISON, H.; JUNG, A.; RAUTENSCHLEIN, S. 2014. *Isolamento e caracterização de Enterococcus cecorum* resistente à vancomicina do genótipo van A de aves de varejo no Japão. *Internacional J. Microbiologia Alimentar*. pp. 372 – 377. Vol. 10. Editora: Associação Veterinária Sul-Africana.

ALBORNOZ, L. A. L., Nakano, V., & Campos, M. J. A. (2014). *Clostridium perfringens* e a enterite necrótica em frangos: principais fatores de virulência genéticos e moleculares. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 51, 178-193. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v51i3p178-193>.

ANGELAKIS, E.; BIBI, F.; RAMASAMY, D.; AZHAR, E.; JIMAN-FATANI, A.A.; ABOUSHOUSAH, S.M. Sequência genômica finalizada não contígua e descrição de *Clostridium saudii* sp. nov. *Standards in Genomic Sciences*, East Lansing, v. 9, n. 8, p. 1-12, dez. 2014.

ARSLAN, A.; YAMAK, U. Comparison of different eggshell thickness measurement methods. *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, Ancara, v. 44, n. 5, p. 1150-1153, out. 2020.

ATTARD, M.R.G.; PORTUGAL, S.T. Climate variability and parente nesting strategies influence gas Exchange across avian eggshells. *Proceedings. Biological Sciences*, Londres, v. 288, n. 1953, p. 1-9, jun. 2021.

BACK, A. **Manual de doença das aves**. Cascavel: Integração, 2010. 211 p.

BADECA, R. DOS S.; VALENTIM, J. K.; GARCIA, R. G.; EBERHART, B. DE S.; SERPA, F. C.; KOMIYAMA, C. M. Alga Calcária na Dieta de Codornas Japonesas Melhora a Espessura da

Casca dos Ovos. **Encontro Internacional de Gestão, Desenvolvimento e Inovação (EIGEDIN)**, Naviraí, v. 4, n. 1, p-1-6, out. 2020.

BAGLEY, S.T. Habitat Association of *Kebsiella* Species. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 52-58, jan. 2015.

BARNES, H.J.; NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J.P. Colibacillosis. **Diseases of poultry**. 12th.ed. Ames: Iowa State Press, 2008. 1409p. Chap.18.

BENAVIDES-REYES, C.; FOLEGATTI, E.; DOMINGUEZ-GASCA, N.; LITTA, G.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RODRIGUEZ-NAVARRO, A. Research Note: Changes in eggshell quality and microstructure related to hen age during a production cycle. **Poultry Science**, Londres, v. 100, n. 9, p. 1-5, set. 2021.

BERRANG, M.; COX, N.A.; FRANK, J.F.; BUHR, R.J. Bacterial Penetration of the Eggshell and Shell Membranes of the Chicken Hatching Egg: a review. **Journal Of Applied Poultry Research**, Atenas, v. 8, n. 4, p. 499-504, 1999.

BISGAARD, M. The influence of infectious bronchitis virus on egg production, fertility, hatchability, and mortality rate in chickens. **Nord. Vet. Med.**, v. 28, 368–376, 1976.

BLANCO, A.E.; BARZ, M.; CAVERO, D. ICKEN, W.; SHARIFI, A.R.; VOSS, M.; BUXADÉ, C.; PREISINGER, R. Caracterização de isolados de *Enterococcus faecalis* por ensaio de letalidade de embriões de galinha. 2018. **Patologia Aviária**, 47, 23–32. doi: 10.1080/03079457.2017.1359404

BORDA-MOLINA, D., ROTH, C., HÉRNANDEZ-ARRIAGA, A., RISSI, D., VOLLMAR, S., RODEHUTSCORD, M., BENNEWITZ, J., CAMARINHA-SILVA, A. Effects on the Ileal Microbiota of Phosphorus and Calcium Utilization, Bird Performance, and Gender in Japanese Quail. **Animals**, Bern, v. 10, n. 885, p. 1-12, mai. 2020.

CARVALHO, L. S. S. (2012). Nutrição de poedeiras em clima quente. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 18, 1–15.

COSTA, Bruno Teixeira Antunes. **Incubação de ovos de ninho e cama e aplicação de antibiótico Ceftiofur em pintos de um dia sobre a eclosão e qualidade dos pintos**. 2021. 40. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

CRUZ, L. C. F.; COSTA, T. F.; SAMPAIO, S. A.; DIAS DA SILVA, N. G.; ABREU, J. M. de; BORGES, K. F.; SALES, G. M.; ALEXANDRINO, S. L. de S. A.; SANTOS, F. R. dos; MINAFRA, C. S. Intestinal

microbiome of birds and its importance. **Research, Society and Development**, Itabira, v. 11, n. 2, jan. 2022.

CROXEN, M.A.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.26-38, 2010. doi.org/10.1038/nrmicro2265.

DEMATTÊ, F. L. C.; PEREIRA, D. C. O. Um novo olhar para o termo probiótico. **Avicultura Industrial**, 9, 42-45. 2018.

[DEVRIESE](#), L.A.; [DUCATELLE](#) R.; UYTTEBROEK, E.; [HAESEBROUCK](#) E. Enterococcus hirae infection and focal necrosis of the brain of chicks. *Vet Rec.* 1991 Oct 5;129(14):316. doi: 10.1136/vr.129.14.316. PMID: 1746106. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

DI FÁBIO, J. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JUNIOR, ANGIO et al. **Doença das aves**. 2. ed. Campinas - SP: Facta, 2009. p. 631-648.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Orgs.). **Doença das aves**. 2th.ed. Campinas: Facta, 2009. chap.4.2, p.457-500.

FIGUEIRA S. V.; MOTA, B. P.; LEONÍDIO, A. R. A.; NASCIMENTO, G. M.; ANDRADE, M. A. microbiota intestinal das aves de produção. *Enciclopedia Bioesfera, Centro científico Conhecer, Goiania, 10 (18), 2181.2014.*

FRANCISCO, N.S. Idade da matriz e tempo de estocagem dos ovos no desenvolvimento de frangos de corte. 2011. 61f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2011.

GARCIA, E. R. M.; ORLANDI, C. C. B.; OLIVEIRA, C. A. L.; CRUZ, F. K.; SANTOS, T. M. B.; OTUTUMI, L. K. Qualidade de ovos de poedeiras semipesadas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, Salvador, v. 11, n.2, p. 505-518, mar. 2010.

GEDEK, B. Probiotics in animal feeding. Effects on performance and animal health. **Feed Manage.**, Sea Isle City, v. 3, n.1, p. 21-24, 1986.

GERLACH, H. Bacteria. In: RITCHIE, B.W.; HARRISON, G.J.; HARRISON, L.R. **Avian medicine: principles and application**. 1.ed. Florida: Wingers Publishing, Inc., 1994. p.949-983.

GHERARDI, S. R. M; VIEIRA, R. P. Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo: revisão de literatura. **Nutritime**, Viçosa, v. 15, n. 3, p. 8172-8181, mai. 2018.

GILMORE, M.S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 16, n. 1, p. 10–16, fev. 2013.

GOUVEIA, L. F.; BUZZATTO LEITE, I.; PINTO, T. M.; SAMPAR, J. F.; MANTOVANI, C. S.; ALVARES, L. E. Será que tem um pintinho? Uma aula prática para desvendar os segredos do ovo de galinha. **Genética na Escola**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 46–58, 2023.

GONÇALVES, A. F. **Análise molecular da resistência a antibióticos, factores de virulência e grupos filogenéticos em *Escherichia coli* e *Enterococcus spp.* de animais.** Dissertação (Mestrado) – Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real, 2009.

GUTIÉRREZ, E.; ORDAZ, G.; REZ, R.; ORTIZ, R.; REZ, A. Effect of the pigmentation, shine, weight, and shape index of the quail egg (*Coturnix coturnix japonica*) on the hatchability rate. **Journal Of Advanced Veterinary And Animal Research**, Local, v. 8, n. 4, p. 1, nov. 2021.

HAMZA, E.; DORGHAM, S.M.; HAMZA, D.A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in broiler poultry farming in Egypt. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Amsterdã, v. 7, n. 1, p. 8-10, dez. 2016.

HUIYAN, M.; SAFIUL, A.; AMIN, Z.; BAKAR, A.M.S.A.; SAALLAH, S.; YUSUF, N.H.M.; SHAARANI, S.M.; SIDDIQUEE, S. Factor Influences for Diagnosis and Vaccination of Avian Infectious Bronchitis Virus (Gammacoronavirus) in Chickens. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 3, p. 47, 2021.

HULET, R.M., WHEELER, E.; ROUSH, W.B. Evaluation of embryonic metabolism and heat production of high yielding broiler breeds: Single stage environment. U.S. **Poultry & Egg Association**, 2007. Disponível em: http://www.uspoultry.org/research/resproj/PROJ_282. Acesso em 28 dez. 2023.

HUTTON, P. Research on eggshell structure and quality. Na historial overview. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.7, n. 2, p. 67-71, apr. 2005.

ITO, R. I. Aspectos nutricionais relacionados à qualidade da casca de ovos. In: **VII Simpósio Técnico de Produção de Ovos - APA**, Anais. São Paulo, APA, 1998. p. 119-138.

JARDIM, F. R. M., STRINGHINI, J. H., CAFÉ, M. B., LEANDRO, N.S.M, CUNHA, W. C. P., NASCIMENTO, J. (2005). The influence of limestone source and particles sizes on performance and eggshell quality of commercial laying hens. **Acta Scientiarum-Animal Sciences**, 27(1), 35–41.

JUNG, A.; CHEN R.L.; SUYEMOTO, M.M.; BARNES, J.H.; BORST B.L. Uma revisão da infecção por *Enterococcus cecorum* em aves, maio de 2018. **Doenças Aviárias**. 62(3): 261-271 (2018). <https://doi.org/10.1637/11825-030618-Review 1>.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic Escherichia Coli. **Nature Reviews Microbiology**, Londres, v. 2, n.1., p-123-140, fev. 2004.

KIM, S.H.; LEE, S.H.; JOO, I.S.; KWAK, H.S.; CHUNG, G.T.; KIM, SH. Detecção rápida de *Salmonella* spp. por ensaio de PCR ultrarrápido em tempo real. **Journal of Food Hygiene and Safety**, Seoul, v. 33, n. 1, p. 50-57, nov. 2018.

KOGUT, M. H. O efeito da modulação do microbioma na saúde intestinal das aves. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdã, v. 250, n. 1, p. 32-40, abr. 2019.

KORVER, D.R. **Calcium nutrition, bone metabolism, and eggshell quality in longer-persisting layer flocks**.. 31st Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, 2020.

KRAIMI, N.; CALANDREAU, L.; BIESSE, M.; RABOT, S.; GUITTON, E.; VELGE, P.; ETERRIER, C. Absence of Gut Microbiota Reduces Emotional Reactivity in Japanese Quails (*Coturnix japonica*). **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 9, n. 603, p. 1-9, mai. 2018.

LAN, R., REEVES, P., OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones, *Infection*, **Genetics and Evolution**, Vol 9. Edição 5. 2009, pp 996-1005,ISSN 1567-1348. doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.011.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R.J.L.; GILMORE, M.S. Diversidade de *Enterococcus*, origens na natureza e colonização intestinal. 2014. **Massachusetts Eye and Ear Infirmary**, Boston, EUA.

MACARI, M., LUNEDO, R., PEDROSO, A. (2014). Microbiota intestinal de aves. In *Produção de Frangos de Corte* (Issue June, p. 565).

MARTINEZ, S.; LOPEZ, M.; BERNARDO, A.; **Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells**. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 37, p. 475-481, 2003.

MAIORKA, A.; DAHLKE, F.; MORGULIS, M. S. F. A. Broiler adaptation to post-hatching period. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n. 2. P. 701-708, 2006.

MATIAS, C. Fatores que afetam a qualidade do ovo. Ergormix, 2020. Disponível em: <https://pt.engormix.com/avicultura/artigos/fatores-afetam-qualidade-ovo-t44745.htm>

MELO, L.D. **Uso da creatina na alimentação in ovo**. 2019. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, S. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Journal of Applied Microbiology**, Londres, v. 83, n. 1, p. 89–99, jan. 1997.

MÜLLER, M. **Comparação da presença de suínos portadores de *Salmonella* sp. no início da fase de terminação e ao abate, em três granjas do Rio Grande do Sul**. Dissertação – UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, 2005.

OLIVEIRA, E. B.; DEMINICIS, R. G. S.; LIMA, M. R.; COSTA, F. G. P.; NASCIMENTO, D. S.; RIBEIRO, T. S. (2017). Impact of intestinal health at poultry. **Open Access Journal of Science**, 1(5), 136-137.

OLIVEIRA, B.B. **Probióticos na avicultura: uma revisão**. 2022. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) – Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2022.

OVIEDO-RONDÓN, E.O. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. **R. Bras. Zootec.**, v.38, p.209-225, 2009.

PADILHA, M.E.Z.; MADUREIRA, E.M.P. Estudo do impacto da translucência, gravidade específica e cor de casca de ovos sobre a mortalidade embrionária e eclodibilidade de pintos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v. 6, n. 1, ago. 2023.

PARSONS, A.H. Structure of the eggshell. **Poultry Science**, Champaign, v. 61, n. 1127, p. 2013-2021, jan. 1982.

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

PEREIRA, C.G.; SARAIVA, G.L.; SANTOS, M.R.; ASSAO, V.S.; FIETTO, J.L.R.; BRESSAN G.C. Isolation and genetic stability of an infectious bronchitis virus strain (IBV). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Viçosa, v. 70, n. 04, p. 1333-1337, ago. 2018.

POPOFF, M.Y.; BOCKENMUHL, J.; GHEESLING, LL. Suplemento 2002 (nº 46) ao esquema Kauffmann-White. **Research on Microbiology**, Amsterdã, v. 155, n. 1, p. 568–570, set. 2004.

QINGYONG, N.; YAN, L.; MINGWANG Z.; QING, Z.; Mingzhou, L. Association of female reproductive tract microbiota with egg production in layer chickens, **Giga Science**, v. 10, n. 9, 2021.

QUINTEROS, J.A.; NOORMOHAMMADI, A.H.; LEE, SW.; BROWNING, G.F.; DIAZ-MÉNDEZ, A. Genomics and pathogenesis of the avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Australian Veterinary Journal**, Sydney, v. 100, n. 10, p.496-512, ago. 2022.

RAMAKRISHNAN, S.; KAPPALA, D. Avian Infectious Bronchitis Virus. In: MALIK, Y.S.; SINGH, R.K.; YADAV, M.P. **Recent Advances in Animal Virology**. 1. ed. Izatnagar: Springer, 2019. p. 301-319.

REIS, T. L.; MORAES, J.M.; CALIXTO, L. F. L.; PIZZOLANTE, C. C. Accuracy of specific gravity assessment days as a measure of layer egg shell quality Exactitud de los días de evaluación de la gravedad específica como medida de la calidad de la cáscara del huevo de gallina , **Research, Society and Developent**, Brasil, v. 10, n. 5, p. 1-6, 2021.

ROSA, P.S.; GUIDONI, A.L.; LIMA, I. L. *et al.* Influência da temperatura de incubação em ovos de matrizes de corte com diferentes idades e classificados por peso sobre os resultados de incubação, Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 1011-1016, 2002.

ROSA, P. S.; ÁVILA, V. S. Variáveis relacionadas ao rendimento da incubação de ovos em matrizes de frangos de corte. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, Concórdia, v. 1, n. 246, p. 1-3, mai. 2000.

RYCHLIK, I. Composição e função da microbiota intestinal de frango. **Animals**, Basel, v. 10, n. 103, p. 1-20, jan. 2020.

SANTOS, B.M.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, V.V. **Doenças virais de importância nas aves**. Viçosa: Ed. UFV, 2005. p.35-40. (Caderno Didático n. 13).

SANTOS, K. R. **Bronquite Infeciosa em Matrizes Pesadas: Relato de Caso**. 2022. 32f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, 2022.

SCHADECK, Marli Marcondes. **Tipo de incubadora e idade de matrizes sobre o rendimento de incubação e qualidade de pintainhos**. 2020. 65f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2020.

SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, **Plos Biology**, São Francisco, v. 14, n. 8, p. 1-16, ago. 2016.

SHABBIR, M.Z.; MALYS, T.; IVANOV, Y.V.; PARK, J.; SHABBIR, M.A.B.; RABBANI, M.; YAQUB, T.; SHANG, Y.; KUMAR, S.; OAKLEY, B.; KIM, W.K. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. **Frontiers in Veterinary Science**, Bern, v. 5, n. 254, p. 1-11, out. 2018.

SHARMA, B. K.; KAKKER, N. K.; BHADOURIYA, S.; CHHABRA, R. Effect of TLR agonist on infections bronchitis virus replication and cytokine expression in embryonated Chicken eggs. **Molecular Immunology**, Londres, v. 120, n.1., p.52-60, abr. 2020.

SHAUFI, M.A.M; SIEO, C.C.; CHONG, C.W.; GAN, H.M.; HO, Y.W. Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses. **Gut Pathogens**, Londres, n. 7, v. 4, p. 1-12, fev. 2015.

SHEHATA, A. M.; PASWAN, V. K.; ATTIA, Y. A.; ABDEL-MONEIM, A.; ABOUGABAL, M. S.; SHARAF, M.; ELMAZOU DY, R.; ALGHAFARI, W. T.; OSMAN, M. A.; FARAG, M. R. Managing Gut. Microbiota through In Ovo Nutrition Influences Early-Life Programming in Broiler Chickens. **Animals**, Bern, v. 11, n. 12, p. 3491, dez. 2021.

STANLEY, D.; HUGHES, R.J.; MOORE, R.J. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlim, v. 98, n. 10, p. 4301–4310, mai. 2014.

SILVA, E. (2020). Manejo na Avicultura: Postura, Iluminação e Incubação dos Ovos.

SILVA, W.; ARAÚJO, LN.; SILVA, E.B.; SOUSA, E. de.; GATO, A. da C.; SILVA, J. Revisão sistemática e cienciométrica da produção de ovos comerciais no Brasil. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, Itabira, v. 9, n. 10, p. 1-19, set. 2020.

TANIKAWA, T.; SHOJI, N.; SONOHARA, S.; SAITO, Y.; SHIMURA, J.; FUKUSHIMA, T.; T. INAMOTO. Aging transition of the bacterial community structure in the chick cecal. *Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University, Akita, Japan*. 2011 **Poultry Science** 90: 1004–1008 doi: 10.3382/ps.2010-01153. 2011.

TUMOVÁ, E.; EBEID, T. Effect of time of oviposition egg quality characteristics in cages and in a litter housing system. **Czech Journal of Animal Science**, Praga, v. 50, n. 3, p. 129–134, 2005.

VAN DEN BRAND, H.; SOSEF, M.P; LOURENS, A; VAN HARN, J. Effects of floor eggs on hatchability and later life performance in broiler chickens. **Poultry Science**, Londres, v. 95, n.5, p. 1025-1032, mai. 2016.

VAN DEN OEVER, A.C.; BOLHUIS, J.E.; VAN DE VEN, L.J.; KEMP, B.; ERODENBURG, T.B. High levels of contact dermatitis and decreased mobility in broiler breeders, but neither have a relationship with floor eggs. **Poultry Science**, Londres, v. 99, n. 7, p.3355-3362, jul. 2020.

VIEIRA, L. A. F. et al. Obtenção de óxido de cálcio a partir da Casca de ovo de galinha. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 3, n. 8, p. 1159–1166, 2017.

YAN, W.; SUN, C.; YUAN, J.; YANG, N. Gut metagenomic analysis reveals prominent roles of *Lactobacillus* and cecal microbiota in chicken feed efficiency. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 7, p. 1-11, mar. 2017.

ZHANG, J.; WANG, Y.; ZHANG, C.; XIONG, M.; RAJPUT, S.A.; LIU, Y.; QI, D. The differences of gonadal hormones and uterine transcriptome during shell calcification of hens laying hard or weak-shelled eggs. **BMC Genomics**, Londres, v. 20, n. 1, p. 1-12, set. 2019.