

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXCREÇÃO DE PATÓGENOS E INOCUIDADE DAS
CARÇAÇAS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM SILAGEM
DE GRÃOS ÚMIDOS DE DESTILARIA

LETÍCIA BORGES NUNES CORREIA

Botucatu - SP
Janeiro, 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EXCREÇÃO DE PATÓGENOS E INOCUIDADE DAS
CARCAÇAS DE BOVINOS ALIMENTADOS COM SILAGEM
DE GRÃOS ÚMIDOS DE DESTILARIA

LETÍCIA BORGES NUNES CORREIA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira
Roça.

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Sicca
Lopes Sampaio.

Botucatu – SP
Janeiro, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Correia, Letícia Borges Nunes
C824e Excreção de patógenos e inocuidade das carcaças de bovinos alimentados com silagem de grãos úmidos de destilaria/ Letícia Borges Nunes Correia. - Botucatu : [s.n.], 2019

107 f.: il. Color., grafs., tabs.

Tese(Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2019

Orientador: Roberto de Oliveira Roça

Coorientador: Guilherme Sicca Lopes Sampaio

Inclui bibliografia

1. *Bos indicus*. 2. Contaminação. 3. Fezes. 4. *Salmonella*
I. Roça, Roberto de Oliveira. II. Sampaio, Guilherme Sicca Lopes. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

Nome do Autor: Letícia Borges Nunes Correia

Título: EXCREÇÃO DE PATÓGENOS E INOCUIDADE DA CARCAÇA DE BOVINOS ALIMENTADOS COM SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE DESTILARIA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Sicca Lopes Sampaio (Presidente e coorientador)

Faculdade de Ciências Agrônômicas

FCA - UNESP - Botucatu, SP

Prof^a. Dr^a. Leila Sabrina Ullmann (Membro Titular)

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FMVZ - UNESP – Botucatu, SP

Prof^a. Dr^a. Julia Arantes Galvão (Membro Titular)

Laboratório de Controle de Qualidade e Segurança de Alimentos

UFPR - Curitiba, PR

Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto (Membro Titular)

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

FMVZ - UNESP – Botucatu, SP

Prof. Dr. Danilo Domingues Millen (Membro Titular)

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica

FCAT - UNESP - Dracena, SP

Data da Defesa: 13 de dezembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu marido Luiz Fernando de Oliveira Correia e a toda minha família por me ajudarem e apoiarem durante essa jornada.

*“Não é preciso vencer na vida, pois a vida não é uma competição para ser vencida,
mas simplesmente para ser vivida”*

Eduardo Marinho

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, Fernando, pelos conselhos cheios de amor e sabedoria e pela paciência inesgotável. Por sempre me encorajar em cada fase dessa conquista.

A minha mãe, Andréa, e ao meu avô e pai, Severino, por sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Ao meu padrasto Emílio, por me adotar com tanta dedicação e carinho.

Aos meus sogros, Josefa e Luiz, pelo carinho e todo apoio, sobretudo os muitos almoços.

Ao meu irmão, Leandro, e tios, Cleber e Aline, por me fazer sentir a pessoa mais inteligente do mundo e a minha cunhada, Joycinha, pelos conselhos que pacificaram e acalmaram o meu coração em muitos momentos.

Ao meu pequeno anjo, Gabriel, que com sua inocência trouxe alegria ao meu coração em momentos difíceis dessa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Roberto de Oliveira Roça, e coorientador, Prof. Guilherme Sicca Lopes Sampaio, pelo conhecimento, amizade, conselhos e acolhimento.

Ao professor Otávio Rodrigues Machado Neto e sua equipe, pelo profissionalismo ao dividir todo seu trabalho com nossa equipe.

Aos professores José Carlos de F. Pantoja e João Pessoa A. Jr. pelos ensinamentos e oportunidades.

A Prof^a. Vera L. M. Rall e técnica Ivana e ao Prof. Rodrigo T. Hernandez e sua orientada Regiane por todo suporte.

Aos colegas de pesquisa Rodolfo, Simony, Sâmea, Fábio, Daniela, Camila, Leila, Luciana, Jaqueline, Bruno, Carolina, Nara, Nataly, Evelyn, Janaína e Leonardo, pela parceria, ensinamentos e amizade.

A Dona Cida, Cris e Edna pelos muitos cafezinhos que serviram de combustível para continuar a maratona.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado processo 164827/2015-3.

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e seu corpo docente, discente e técnico, pelo apoio físico e humano à realização dessa pesquisa.

A todos que passaram por minha vida durante essa longa jornada.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Ingredientes das dietas oferecidas no período de adaptação	21
TABELA 2. Ingredientes e conteúdo nutricional das dietas oferecidas no período de terminação	22
TABELA 3. Descrição dos <i>primers</i> utilizados	28
TABELA 4. Cálculo do tamanho da amostra baseado na ocorrência de STEC na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de grãos úmidos de destilaria (WDG)	32
TABELA 5. Ocorrência ajustada e <i>odds ratio</i> de coliformes totais e <i>E. coli</i> não patogênica na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	35
TABELA 6. Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis avaliadas na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	36
TABELA 7. Ocorrência global e <i>odds ratio</i> de STEC (<i>stx</i> ₁ e/ou <i>stx</i> ₂) na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	38
TABELA 8. Ocorrência ajustada e <i>odds ratio</i> de STEC (<i>stx</i> ₂) e EPEC (<i>eae</i>) na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	39
TABELA 9. Ocorrência ajustada e <i>odds ratio</i> de STEC (<i>stx</i> ₁ e/ou <i>stx</i> ₂) e EPEC (<i>eae</i>) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	40
TABELA 10. Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis físico-químicas avaliadas nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	42
TABELA 11. Média dos quadrados mínimos e IC 95% da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	43
TABELA 12. Média dos quadrados mínimos e IC 95% da proporção de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	44
TABELA 13. Média dos quadrados mínimos e IC 95% de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG).	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fluxograma simplificado da produção de etanol de milho (ROSENTRATER, 2012).....	5
FIGURA 2. Animais experimentais no primeiro dia de confinamento	19
FIGURA 3. Animais experimentais após 132 dias de confinamento	20
FIGURA 4. Armazenamento do grão úmido de destilaria em silos-bolsa e aplicação de inoculante <i>Feedtech™ F600</i>	20
FIGURA 5. Ocorrência ajustada e IC 95% de coliformes totais e <i>E. coli</i> não patogênica na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	36
FIGURA 6. Ocorrência e IC 95% de STEC (<i>stx</i> ₁ e/ou <i>stx</i> ₂) e EPEC (<i>eae</i>) nas fezes e superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG).....	40

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Demanda mundial por energia renovável.....	4
2.2 Grãos de destilaria na nutrição de bovinos de corte.....	6
2.3 Grãos de destilaria e inocuidade da carne bovina	8
2.5 Estratégias para redução de patógenos na carne bovina in natura.....	16
3 OBJETIVOS	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Delineamento experimental.....	20
4.2 Colheita de amostras	23
4.2.1 Suabe da junção reto anal e colheita das fezes.....	23
4.2.2 Esponja de carcaça	24
4.3 Análises microbianas.....	24
4.3.1 Indicadores higiênicos e sanitários na carcaça.....	24
4.4 Análises físico-químicas das fezes.....	25
4.4.1 Determinação de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA).....	25
4.4.2 Quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV)	25
4.4.3 Determinação de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB) e amido.....	26
4.4.4 Determinação de ácido láctico	26
4.4.5 Determinação do pH.....	27
4.3.2 Preparo das alíquotas para análises moleculares	27
4.3.3 Análises moleculares.....	28
4.5 Processamento estatístico.....	32
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ARTIGO CIENTÍFICO.....	78
ANEXO.....	104

CORREIA, L.B.N. **Excreção de patógenos e inocuidade da carcaça de bovinos alimentados com silagem de grãos úmidos de destilaria.** Botucatu, 2018. 107p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a excreção de patógenos e inocuidade da carcaça de bovinos alimentados com diferentes níveis de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG). Um total de 100 bovinos machos não castrados, 50% Angus e 50% Nelore, foram divididos aleatoriamente entre quatro dietas (N = 25) compostas por diferentes níveis de silagem de WDG (0, 15, 30 e 45% da matéria seca dietética). Amostras de fezes foram colhidas por meio de suabe da junção reto anal, 15 dias antes do abate, para determinar as ocorrências e quantificação de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *Salmonella* spp. por meio da técnica qPCR. Também foram colhidas, 52 dias antes do abate, amostras de fezes de cada animal do piso do curral, logo após defecação, as quais foram submetidas a análises físico-químicas. Logo após o abate, a ocorrência e a contagem de indicadores higiênicos e sanitários, *E. coli* não patogênica, coliformes totais e bactérias aeróbias mesófilas, assim como, a ocorrência de STEC, EPEC e *Salmonella* spp., foram determinados a partir de amostras colhidas por meio de esponja da superfície das carcaças das regiões do coxão, flanco, peito e pescoço. Os resultados quantitativos foram submetidos a análises de variância e os dados binários foram submetidos a análises logísticas com razão de chances. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SAS 9.4 considerando um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os tratamentos para a ocorrência e contagem de coliformes totais e *E. coli* não patogênica, assim como para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de carcaças ($P > 0,05$). A ocorrência de STEC nas fezes foi de 91,7, 95,7, 100 e 92% e nas carcaças de 20,4, 12,8, 7,3 e 3,7% nos tratamentos 0, 15, 30 45% de WDG, respectivamente ($P > 0,05$). Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na ocorrência de STEC, a ocorrência observada nesse estudo foi elevada, o que indica risco a saúde pública. Em conclusão, a inclusão de WDG na dieta não influenciou no aumento da ocorrência de patógenos nas fezes e carcaças de bovinos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, contaminação, fezes, *Salmonella*, STEC, EPEC, WDG.

CORREIA, L.B.N. **Pathogens shedding and carcasses safety of cattle fed with distillers wet grains silage**. Botucatu, 2018. 107p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the pathogen excretion and carcass safety of cattle fed different levels of inoculated silage from degreased wet distillery grains (WDG). A total of 100 male, 50% Angus and 50% Nelore male bulls were randomly divided into four diets (N = 25) composed of different levels of WDG silage (0, 15, 30 and 45% of dietary dry matter) . Stool specimens were collected by rectal anal junction swab 15 days prior to slaughter to determine the occurrences and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *E. coli* enteropathogenic (EPEC) and *Salmonella* spp. by the qPCR technique. Samples of faeces from each animal on the corral floor were also collected, 52 days before slaughter, immediately after defecation, which were submitted to physical-chemical analysis. Immediately after slaughtering, the occurrence and counting of hygienic and sanitary indicators, non-pathogenic *E. coli*, total coliforms, and mesophilic aerobic bacteria, as well as the occurrence of STEC, EPEC and *Salmonella* spp., were determined from samples collected by medium of the surface of the carcasses of the regions of the tail, flank, chest and neck. The quantitative results were submitted to analysis of variance and the binary data were submitted to logistic analyzes with odds ratio. All statistical analyzes were performed in SAS 9.4 statistical software considering a significance level of 5%. The results showed that there was no difference between treatments for the occurrence and counts of total coliforms and non-pathogenic *E. coli*, as well as for the counting of mesophilic aerobic bacteria in the carcass samples ($P > 0.05$). The occurrence of stool STEC was 91.7, 95.7, 100 and 92% and in the carcasses of 20.4, 12.8, 7.3 and 3.7% in treatments 0, 15, 30, 45% of WDG, respectively ($P > 0.05$). All samples were negative for *Salmonella* spp. Although no significant differences were found in the occurrence of STEC, the occurrence observed in this study was high, which indicates a risk to public health. In conclusion, the inclusion of WDG in the diet did not influence in the increase of the pathogen occurrence in the feces and bovine carcasses.

Key Words: *Bos indicus*, contamination, feces, *Salmonella*, STEC, EPEC, WDG.

1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. e as *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enteropatogênicas (EPEC) são os principais perigos biológicos associados à contaminação da carne bovina *in natura*. Os bovinos são considerados reservatórios assintomáticos de STEC e estão relacionados à maioria dos surtos e óbitos de humanos (MUGHINI-GRAS et al. 2018). Em relação à *Salmonella* spp., embora seja mais comum nas cadeias produtivas de aves e suínos, os sorotipos mais frequentes em infecções humanas também podem ser isolados de bovinos (MUGHINI-GRAS et al., 2014; IGLESIAS et al., 2017).

Durante o abate bovino, a pele é a principal fonte de transmissão de STEC e *Salmonella* spp. para a carcaça e sua contaminação está relacionada com o aumento da excreção desses patógenos nas fezes, sobretudo, no período pré-abate (MCKIEARNAN et al., 2016; ARTHUR et al., 2017). Diversos fatores têm sido associados com o aumento dessa excreção, incluindo principalmente a sazonalidade (VENEGAS-VARGAS et al., 2016; WEBB et al., 2017), idade (MIR et al., 2016) e dieta (JACOB et al., 2010; BERRY et al., 2017).

Em relação à dieta, diante da expansão da indústria de etanol de milho no Brasil aliada ao contínuo crescimento e competitividade do mercado de nutrição animal, o uso de grãos de destilaria (*Distillers Grains* - DG), coproduto da fermentação de etanol de milho, na nutrição de bovinos de corte tem aumentado no país (COSTA, 2016; SILVA et al., 2016). Entretanto, estudos realizados em outros países demonstraram que bovinos alimentados com dietas contendo DG apresentam maior excreção de *E. coli* patogênica nas fezes do que bovinos alimentados com dietas sem DG (JACOB et al., 2008; JACOB et al., 2010; EDRINGTON et al., 2013; BERRY et al., 2017; FINK et al., 2018).

O principal mecanismo envolvido no aumento dessa excreção se deve ao coproduto apresentar alta degradação no rúmen, o que faz com que ocorra o aumento do pH e diminuição na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) no intestino grosso (JACOB et al., 2010; EDRINGTON et al., 2013). Esse processo cria condições favoráveis para o crescimento e multiplicação de STEC e *Salmonella* spp. no intestino grosso e junção reto anal, locais de predileção dessas enterobactérias (CALLAWAY et al., 2013; CROSSLAND et al., 2015).

A maioria dos estudos sobre esse tema foi realizado nos Estados Unidos da América (EUA), que apresenta características produtivas diferentes em relação ao Brasil, o que pode limitar a extrapolação de resultados (JACOB et al., 2010; BERRY et al., 2017; FINK et al., 2018).

Nos EUA, os sistemas de produção de carne bovina caracterizam-se pela predominância de animais *Bos taurus* mantidos em confinamentos, onde recebem dietas com altas concentrações de grãos (USDA, 2016). Enquanto que no Brasil, os sistemas produtivos são caracterizados pela dependência quase que exclusiva de pastagens, principalmente para cria e recria de bovinos, assim como, para a terminação de quase 80% do rebanho. Além disso, existe o predomínio de animais *Bos indicus*, cerca de 90% dos bovinos, principalmente com características da raça Nelore, que correspondem a aproximadamente 80% do rebanho de corte brasileiro (OLIVEIRA; MILLEN, 2014; MCMANUS et al., 2016). Essas diferenças entre as raças predominantes nos EUA e Brasil são importantes principalmente em relação à capacidade de metabolização do amido. Animais zebuínos, quando consomem dietas com alto teor de amido, desenvolvem com mais frequência problemas de acidose do que animais taurinos, o que resulta em maior incidência de ruminite (MILLEN et al., 2015).

Além dessas diferenças raciais, as características predominantes nas práticas de nutrição adotadas nos EUA são diferentes das que ocorrem no Brasil, sobretudo, no que diz respeito ao tipo de processamento do milho e composição da dieta (OLIVEIRA; MILLEN, 2014; SAMUELSON et al., 2016), nível de inclusão de DG (SAMUELSON et al., 2016; COSTA, 2016) e características do grão de milho (LINO, 2014; LEE et al., 2016).

Quanto menos processado for o grão de milho, como ocorre no Brasil, quebrado e moído fino, menor será a degradação de amido no rúmen e maior será a degradação pós-rúmen. Isso ocorre devido a maior quantidade de amido que será degradado no intestino grosso, o que leva ao aumento na concentração de AGV e diminuição do pH nesse local (FOX et al., 2007; OLIVEIRA; MILLEN, 2014). Além disso, o grão de milho produzido no Brasil possui mais zeína do que o grão dos EUA. Essa proteína está associada com a “vitrosidade” e com a textura do grão. Portanto, os grãos brasileiros são mais “vítreos” e duros do que os grãos americanos, o que confere menor degradação de amido no rúmen (LINO, 2014; LEE et al., 2016).

Outro aspecto que diferencia o presente estudo dos demais estudos, é que pelo conhecimento dos autores, esse é o primeiro estudo que utilizou o coproduto da forma de silagem inoculada. Devido ao clima tropical e úmido do Brasil, recomenda-se que o DG seja ensilado, com o objetivo de assegurar sua conservação e evitar que seja deteriorado. Esse método de produção de silagem é baseado na fermentação láctica da matéria vegetal através da inoculação de produtos que possuem em sua composição bactérias lácticas, principalmente do gênero *Lactobacillus*. Essas bactérias produzem ácido láctico e outros

ácidos graxos, o que leva a diminuição do pH e um ambiente de anaerobiose (BORREANI et al., 2018). Esse processo de conservação usado no DG brasileiro faz com que o coproduto apresente características particulares em relação aos comumente usados em outros países e que podem influenciar na excreção de patógenos nas fezes visto que o uso de bactérias lácticas como probióticos é comum na produção animal com o objetivo de evitar o crescimento de patógenos (CAI et al., 2014; CASTELLANO et al., 2017).

A composição físico-química do DG é outra característica que pode variar entre diferentes lotes de milho dentro de uma mesma usina de etanol, assim como, entre diferentes usinas, conforme o procedimento adotado por cada unidade produtora. Por exemplo, o teor de lipídios pode ser alto, de 11 a 13%. No Brasil, devido à coprodução de óleo de milho, o DG produzido, normalmente é desengordurado. Os constituintes mais variáveis na composição do DG são gordura, fibras, cinzas, lisina, triptofano e fósforo (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011).

Diante das diferenças nas características produtivas e, principalmente, nas condições dietéticas praticadas no Brasil, assim como a forma como o coproduto é fornecido, ensilado, inoculado e desengordurado, é inadequado extrapolar os conhecimentos existentes sem a realização de estudos nacionais que demonstrem a influência do DG na excreção de patógenos nas fezes de bovinos de corte no cenário produtivo da pecuária nacional. Desta forma, o objetivo geral desse projeto foi determinar a excreção de patógenos e a inocuidade da carcaça de bovinos cruzados (F1 Angus x Nelore) submetidos a dietas com alto teor de energia confinamento com diferentes níveis de grãos úmidos de destilaria (WDG). Os resultados desse estudo servirão de subsídios técnico-científicos para recomendar o uso de DG na dieta de bovinos cruzados em confinamentos brasileiros sem prejudicar a inocuidade da carne *in natura*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Demanda mundial por energia renovável

A demanda mundial por biocombustíveis tem impulsionado países industrializados a desenvolverem suas próprias tecnologias, de modo a fomentar fontes de energia com menor impacto ao meio ambiente, aumentar a segurança bioenergética e reduzir a dependência das importações de petróleo (LIEW et al., 2014; HO et al., 2014). O Brasil tem um dos mais bem sucedidos programas de energia renovável do mundo com a cana de açúcar, resultado da implantação do Programa Nacional do Álcool (Pró-Álcool) em 1975. Embora a tecnologia brasileira permita produzir em um hectare de cana quase o triplo de etanol em relação à mesma área de milho, o país tem perdido espaço no mercado de biocombustíveis devido à ociosidade operacional das fábricas no período da entressafra da cana de açúcar, compreendida entre dezembro a março (SU et al., 2015; LOPES et al., 2016; ECKERT et al., 2018).

Em vista do potencial agrícola brasileiro, que em 2017 obteve recorde histórico na produção de grãos (GELLER, 2017; CONAB, 2018), desde 2010, o excedente da produção de milho, principalmente por estados com elevada produção de grãos como o Mato Grosso, tem sido utilizado por fábricas modificadas (*flex*) para otimizar a produção de etanol durante a entressafra da cana de açúcar (MILANEZ et al., 2014; ECKERT et al., 2018). Cerca de 80% dos equipamentos utilizados em usinas de cana de açúcar também podem ser utilizados no processamento do milho para a produção de etanol. Embora tenha menor produção por área plantada em relação à cana de açúcar, o milho se destaca pela facilidade de armazenamento e estocagem, além do baixo custo em regiões com produção excedente (ROSENTRATER, 2012; JÚNIOR, 2017).

No Brasil existem quatro usinas *flex*: Libra, Usimat e Porto Seguro; localizadas, respectivamente, nos municípios de São José do Rio Claro, Campos de Júlio e Jaciara, todas no estado do Mato Grosso e a usina SJC Bioenergia no estado de Goiás. Em agosto de 2017, no município de Lucas do Rio Verde, MT, foi inaugurada a Fiagril, primeira usina nacional de etanol produzido 100% a partir do milho (COSTA, 2016; FLÁVIA, 2017; MEDEIROS, 2018). Com o aumento do consumo de etanol previsto para os próximos anos, as indústrias de etanol em parceria com o governo federal pretendem ampliar a produção do biocombustível no país através de projetos que visam transformar todas as usinas mato-grossenses em *flex* (FLÁVIA, 2017).

O processo de produção do etanol a partir do milho envolve etapas de moagem, cozimento, liquefação, sacarificação, fermentação e destilação, o que resulta em

coprodutos fluídos e sólidos concentrados (Figura 1) (ROSENTRATER et al., 2012). De acordo com a *Association of Feed Control Officials* (AAFCO), os principais coprodutos desse processo são: Grãos úmidos de Destilaria, do inglês *Wet Distillers Grains* (WDG), obtido após a centrifugação da vinhaça completa que também gera a vinhaça fina (VF), com a qual se obtêm os solúveis de destilação condensados. Esses podem ser adicionados ao WDG, formando os grãos úmidos de destilaria com solúveis (*Wet Distillers Grains with Solubles*), ou WDGS, o qual quando submetido à secagem obtém-se o DDGS (*Dry Distillers Grains with Solubles*). Caso seja realizada a secagem sem incorporação dos solúveis de destilação têm-se os Grãos Secos de Destilaria (*Dry Distillers Grains*), conhecido pela sigla DDG (ROSENTRATER, 2012).

Algumas usinas secam parcialmente o WDGS, o que gera os grãos de destilaria modificados com (MDG + S) ou sem solúveis (MDG), que possuem de 42 a 50% de MS, enquanto que o DDGS e o WDGS possuem aproximadamente 90 e 35% de MS, respectivamente (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011; ROSENTRATER, 2012).

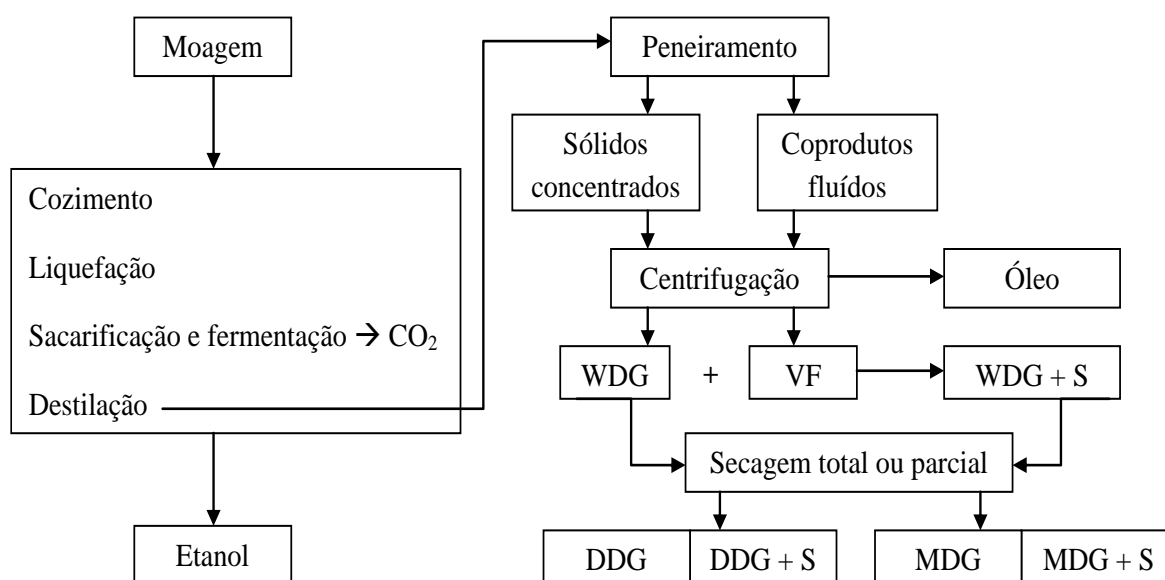


FIGURA 1. Fluxograma simplificado da produção de etanol de milho (ROSENTRATER, 2012).

De forma geral, 25,4 kg de grãos de milho rendem aproximadamente 11 litros de etanol, 8,2 kg de dióxido de carbono e 8,2 kg de DG. Esses valores podem variar de acordo com as práticas de produção, tipo de equipamento, condições ambientais, composição e qualidade do milho e localização geográfica da produção do grão de milho (ROSENTRATER et al., 2012). No primeiro ano de funcionamento, a usina *flex* Porto Seguro processou 62 mil toneladas de grão de milho, o que gerou aproximadamente 15 mil

toneladas de DG. A usina Fiagril, na primeira fase de produção processou 500 mil toneladas do grão, o que resultou em 170 mil toneladas do coproduto. As projeções para o futuro apontam o processamento de 10 milhões de toneladas de grão de milho que irão gerar aproximadamente três milhões de toneladas de DG (COSTA, 2016; MEDEIROS, 2018).

2.2 Grãos de destilaria na nutrição de bovinos de corte

O contínuo crescimento e competitividade do mercado de nutrição animal, impulsionado principalmente pelos preços das culturas de soja e milho, induziram a procura por ingredientes alternativos que substituam os comumente utilizados na alimentação humana, de forma a reduzir a concorrência e custos da produção animal, sem comprometer a eficiência produtiva e qualidade do produto final (ROSENTRATER, 2012; COSTA, 2016; SILVA et al., 2016).

Na produção de etanol de milho, o amido é fermentado em etanol, restando fibra, proteína e gordura. O teor de proteína é concentrado, passando de 10% no milho para 30% no DG (AHERN et al., 2016). Portanto, o milho que antes era utilizado principalmente como fonte de energia é convertido em fonte de proteína no coproduto. Desta forma, a produção em grande escala de etanol de milho pode mudar o paradigma e a proteína deixar de ser mais cara que a energia (ROSENTRATER, 2012). Devido ao alto valor proteico e energético, o DG é um coproduto interessante como substituto aos tradicionalmente utilizados em dietas de bovinos de corte, como o milho e o farelo de soja, tanto em sistemas semi-intensivos como intensivos (ROSENTRATER, 2012; COSTA, 2016; AHERN et al., 2016; SALIM et al., 2016).

Desde 1990, esse coproduto tem sido usado como substituto do milho em confinamentos dos EUA. Devido à alta produção de etanol de milho nesse país, o coproduto é usado na nutrição animal principalmente como fonte de energia (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011; ROSENTRATER, 2012; SAMUELSON et al., 2016). No Brasil, devido à baixa oferta de DG, desde 2013, confinamentos no Mato Grosso passaram a utilizá-lo na dieta de bovinos como fonte proteica em substituição ao farelo de soja. Também tem sido adicionado à dieta de animais confinados em outros estados, como no Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais (CONAB, 2018; JÚNIOR, 2017). Na prática, a inclusão em dietas de confinamento de bovinos de corte consiste em 15% da MS como fonte proteica, substituindo em 100% o farelo de soja. Como fonte energética, tem-se adotado entre 30 e 50% da inclusão do milho. (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011).

O DG possui em média 30% de proteína bruta, 10% de gordura e até 12% de amido. Com relação às fibras, apresenta de 5 a 10% de fibra bruta, no mínimo 40% de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e 6 a 13% de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), o que o caracteriza como um coproduto com alta concentração de hemicelulose (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011; ROSENTRATER, 2012; AHERN et al., 2016). A porção proteica consiste basicamente de zeína, proteína derivada do endosperma do grão de milho (LIU, 2012), sendo um coproduto com baixa degradação proteica no rúmen, aproximadamente 40% (DICOSTANZO; WRIGH, 2012).

O uso de DG em maiores proporções como fonte de energia exige cuidados, pois durante o processamento do milho para produção de etanol é adicionado dióxido de enxofre e ácido sulfúrico com o objetivo de controlar do pH na etapa de fermentação (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011; ROSENTRATER et al., 2012; LIU, 2012). Esse procedimento faz com que os produtos finais apresentem entre 0,74 a 1,09% de enxofre (THIEX, 2012), o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de polioencefalomalácia (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011). A recomendação do *Nutrient Requirements of Beef Cattle* para enxofre é de 0,15% da MS da dieta (NRC, 2016). Além disso, quando o DG é adicionado em níveis maiores que 15 a 20% pode ocorrer excesso de fósforo na dieta, que deve ser corrigido pela adição de cálcio para manter a razão Ca:P adequada (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011; THIEX, 2012).

Outro aspecto importante diz respeito à contaminação bacteriana do grão de milho, que compromete a fermentação e o rendimento da produção de etanol. Antibióticos como virginamicina, tetraciclina, eritromicina e penicilina têm sido utilizados para controlar a proliferação bacteriana durante a etapa de fermentação na produção de etanol. Entretanto, existe a preocupação com o aumento da resistência bacteriana a esses antimicrobianos, além do risco de resíduos de antibióticos no coproduto e, conseqüentemente, nos tecidos dos animais destinados ao consumo humano (THIEX, 2012).

Em relação ao desempenho produtivo, pesquisas norte-americanas demonstraram que bovinos de corte suplementados com dietas contendo DG apresentaram desempenho semelhante aos animais alimentados com outras fontes de proteína, como: farelo de soja, grão de milho inteiro e milho processado (DICOSTANZO; CRAWFORD, 2013; CHAPPLE et al., 2015; GUNN et al., 2017; BURHOOP, 2017). Ademais, a suplementação com DG com solúveis (DDGS) para bovinos mantidos em pastagens e com dietas à base de forragem mostrou-se promissora, visto que o coproduto possui valor energético igual ou superior ao milho laminado a seco e outros ingredientes convencionais (LEHMKUHLER;

BURRIS, 2011).

Recentemente no Brasil, o Centro de Pesquisa da Nutripura realizou um estudo com 960 bovinos inteiros da raça Nelore e demonstrou que os animais alimentados com 15% de DDG na MS apresentaram 14,15% menor custo de produção em relação aos bovinos alimentados com dieta tradicional, composta por 3% de farelo de soja e 12% de caroço de algodão. Esses animais também apresentaram maior ganho de peso e melhor eficiência alimentar devido ao maior teor energético do DDG em relação ao farelo de soja e o caroço de algodão, o que resultou em lucro final 26,86% maior (COSTA, 2016).

O DG têm se mostrado como uma alternativa atrativa na nutrição de bovinos de corte no Brasil, no entanto, mesmo com o crescente uso pelos produtores brasileiros, estudos sobre a sua utilização nas condições dietéticas praticadas nos confinamentos nacionais são escassos, portanto, não se sabe qual o nível de concentração ideal para a utilização do coproduto no país. Em virtude do crescente interesse dos produtores em reduzir os custos com a nutrição sem prejudicar o desempenho produtivo e, sobretudo, a qualidade da carne, são necessários mais estudos que avaliem a influência do DG na eficiência da bovinocultura de corte nacional.

2.3 Grãos de destilaria e inocuidade da carne bovina

Os recentes escândalos envolvendo a carne bovina no Brasil colocam em evidência a importância da inocuidade dos alimentos. A carne bovina é uma das principais fontes de proteína consumida no mundo todo (SANS; COMBRIS, 2015; PASIAKOS et al., 2015). No entanto, a complexidade do seu sistema produtivo e suas características intrínsecas favorecem a contaminação e o crescimento de uma ampla variedade de micro-organismos, tornando-a responsável pela transmissão de diversos patógenos ao homem (NIYONZIMA et al., 2015).

Devido à subnotificação e limitação de informações, é difícil mensurar o número real de surtos atribuídos ao seu consumo (SCALLAN et al., 2011; NIYONZIMA et al., 2015). Greig e Ravel (2009), em estudo sobre dados de surtos publicados mundialmente, verificaram que dos 4093 surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados entre 1988 a 2007, 12,7% foram atribuídos à carne bovina, enquanto que 9% e 4,9% foram associados ao consumo de carne de frango e suíno, respectivamente.

No Brasil, junto com processados e miúdos, a carne bovina *in natura* foi responsável por 2,4% (N = 12.503) dos surtos de doenças de origem alimentar ocorridos entre 2000 a 2017 (BRASIL, 2018). Resultados encontrados por Painter et al. (2013) nos

EUA ao longo de 10 anos demonstraram que a carne bovina esteve envolvida em 5,4% (N = 3075) das hospitalizações a cada ano.

A qualidade da carne bovina está condicionada a fatores que se estendem desde as práticas adotadas no campo até a manipulação pelo consumidor final (NIYONZIMA et al., 2015). Durante o abate a pele é a principal fonte de transmissão de patógenos para a carcaça e sua contaminação está relacionada com o aumento da excreção de patógenos nas fezes, principalmente no período pré-abate (MCKIEARNAN et al., 2016; ARTHUR et al., 2017).

Diversos fatores de risco têm sido associados com o aumento dessa excreção, dentre eles, o manejo dietético. O tipo de dieta baseado na composição (volumoso vs concentrado), forma de apresentação e qualidade influenciam na taxa de fermentação microbiana interferindo na excreção de patógenos nas fezes (FOX et al., 2007; JACOB et al., 2010; BERRY et al., 2017).

Dietas com alta taxa fermentativa têm maior metabolismo microbiano no rúmen, sobrando poucos nutrientes para serem degradados no intestino grosso, com menor taxa fermentativa ocorrendo neste local, irá ter menor produção de AGV e conseqüentemente o aumento do pH, o que cria um ambiente favorável para o crescimento e multiplicação de enterobactérias (CALLAWAY et al., 2013; CROSSLAND et al., 2015). Uma vez que o intestino grosso é o local de predileção para a colonização de patógenos como a STEC (SWAGGERTY et al., 2018).

Diez-Gonzalez et al. (1998) verificaram que bovinos alimentados com dietas à base de grãos excretaram mais patógenos nas fezes do que os alimentados com uma dieta à base de feno. Os autores demonstraram que a adição progressiva de grãos na dieta aumentou em 1000 vezes a quantidade de bactérias anaeróbias no intestino grosso.

A redução na excreção de patógenos associada com a dieta à base de forrageira ocorre devido a mecanismos de exclusão competitiva, bem como, pela remoção física de patógenos e pela ação antimicrobiana de compostos fenólicos e polifenólicos, tais como: lignina e taninos presentes nos vegetais. Entretanto, não há consenso científico de que a dieta possa influenciar na excreção de patógenos em condições de campo (CALLAWAY et al., 2013; USDA-FSIS, 2014).

Van-Baale et al. (2004) em ensaio clínico com 12 bovinos canulados, demonstraram que aos 28 dias de experimento os animais alimentados com dieta à base de feno apresentaram maiores concentrações de *E. coli* O157:H7 nas fezes, $7,2 \times 10^3$ UFC/g, do que os animais alimentados com dieta à base de grãos, os quais foram negativos em 28 dias

($P < 0,05$). Os autores também reportaram que o pH ruminal dos animais alimentados com forrageira foi maior do que nos animais alimentados com grãos ($P < 0,05$), o que não concorda com os resultados de Diez-Gonzalez et al. (1998).

Outro fator diz respeito à forma de apresentação do grão. Fox et al. (2007) em ensaio clínico com 347 novilhas confinadas, verificaram que a prevalência média de *E. coli* O157:H7 em nove dias de experimento foi maior em bovinos alimentados com milho floculado do que os animais que receberam o milho laminado, 65% e 30%, respectivamente ($P < 0,001$). Segundo estes autores, isso provavelmente ocorre devido à menor quantidade de amido que passa para o intestino grosso na dieta a base de milho em flocos, o que leva a diminuição nas concentrações de AGV e aumento do pH nesse local.

Quanto a associação entre o DG e o aumento na excreção de patógenos, Jacob et al. (2010) avaliaram 3350 amostras de fezes colhidas no período de 12 semanas e demonstraram que a prevalência de *E. coli* O157:H7 foi maior em animais alimentados com 40% de DG do que os alimentados com 0 e 20% de inclusão do grão na dieta ($P \leq 0,05$). Os mesmos autores em ensaio clínico não encontram diferença na excreção de *Salmonella* spp. em bovinos alimentados com 0 e 25% de inclusão de DG na dieta ($P > 0,05$) (JACOB et al., 2008).

Recentemente, outros estudos foram realizados com objetivo de compreender o papel do DG na excreção de patógenos. No entanto, os resultados são controversos, sobretudo, no que diz respeito a partir de que nível de inclusão o DG pode contribuir para o aumento dessa excreção. Além disso, outros fatores, como sazonalidade e composição da dieta podem confundir o real papel do coproduto na excreção de patógenos nas fezes de bovinos (BERRY et al., 2017; FINK et al., 2018).

Em estudo com 4138 amostras de fezes de 1211 bovinos, Fink et al. (2018) verificaram que não houve diferença significativa na excreção de *E. coli* O157 entre os animais alimentados com e sem DG. No entanto, os autores verificaram forte interação entre a dieta e a sazonalidade, demonstrando que os animais alimentados com o DG durante o verão foram mais propensos a excretar *E. coli* O157:H7 do que animais que não foram alimentados com o grão na mesma estação ($P < 0,01$).

Como mencionado no tópico 1 desse estudo, a maioria das pesquisas sobre o uso de DG na alimentação de bovinos de corte foi realizada nos EUA. Entretanto, diante das diferenças nas características produtivas e, principalmente, nas condições dietéticas praticadas no Brasil, é inadequado extrapolar os conhecimentos existentes sem a realização de estudos nacionais que demonstrem a influência do DG na excreção de patógenos nas

fezes de bovinos de corte no cenário produtivo da pecuária nacional.

2.4 Perigos biológicos associados à carne bovina

A condição higiênica e sanitária da carne bovina pode ser avaliada por meio da pesquisa de bactérias indicadoras como: aeróbias mesófilas, coliformes totais e *E. coli* não patogênica. Além de estimar a população de micro-organismos presentes na carne, altas contagens desses indicadores mostram que existem condições favoráveis para a ocorrência de patógenos como STEC e *Salmonella* spp. (RUBY et al., 2007; GHAFIR et al., 2008; BARCO et al., 2015; PETRUZZELLI et al., 2016; SCHEINBERG et al., 2017). Além disso, os dados de indicadores são fundamentais para a verificação e validação de programas preventivos de controle de qualidade, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e Boas Práticas de Fabricação (MILIOS et al., 2014; TOMASEVIC et al., 2016).

Dentre os perigos biológicos associados à carne bovina, a *Salmonella* spp. e *E. coli* patogênica são as principais causas de infecções em humanos (GREIG; RAVEL, 2009; NIYONZIMA et al., 2015). Greig e Ravel (2009) demonstraram que dos 4093 surtos ocorridos mundialmente entre 1988 a 2007, 27,4% e 34,6% foram atribuídos ao consumo de carne bovina contaminada por *Salmonella* spp. e *E. coli* patogênica, respectivamente. No Brasil, dados oficiais reportam que a ocorrência de STEC do grupo *big seven* (O26, O45, O103, O111, O121, O145 e O157:H7) na carne bovina *in natura* em 2016 foi de 0,22% (N = 938), enquanto que a *Salmonella* spp. foi identificada em 2,57% (N = 933) das amostras (BRASIL, 2017).

E. coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família das Enterobacteriaceae. Foi descrita em 1885 como uma bactéria comensal da microbiota intestinal de humanos e animais. Anos depois foi verificada a capacidade de algumas cepas de apresentarem fatores de virulência, como a produção de toxinas capazes de causarem danos irreversíveis em células de rim de macaco verde africano (células *Vero*), sendo descrita pela primeira vez em 1977, surgindo o termo verotoxina. Em humanos, esses fatores de virulência são capazes de causar infecções no trato geniturinário, meningite e septicemias (BERTÃO; SARIDAKIS, 2007; BLOUNT, 2015).

E. coli pode ser classificada sorologicamente em sorogrupos, pelo antígeno “O” (somático) dos lipopolissacarídeos de membrana, e em sorotipos, por meio do antígeno “H” do flagelo bacteriano (GYLES, 2007; GYLES; FAIRBROTHER, 2010), assim como em patotipos, de acordo com a patogenicidade e sintomas clínicos, os quais estão

diretamente relacionados aos fatores de virulência de doenças no trato gastrointestinal (TGI) (CDC, 2015). Seis patotipos são associados à diarreia em humanos e são coletivamente referidos como *E. coli* diarreiogênicas (DEC): *E. coli* produtora de toxinas Shiga (STEC), sendo essa a mais frequentemente envolvida nas toxi-infecções de origem alimentar em humanos; *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC, ou EAggEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); e *E. coli* Aderente Difusa (DAEC) (CDC, 2015; VILA et al., 2016).

Dentre as diferentes classes de DEC, as STEC e EPEC têm se destacado pela relação com a ingestão de alimentos de origem animal. Animais ruminantes, especialmente os bovinos, são os principais reservatórios naturais desses patotipos, e estão epidemiologicamente relacionados à maioria dos surtos e mortes de humanos (BAKER et al., 2016; BUNCIC et al., 2014; CROSSLAND et al., 2015; DUFFY et al., 2014).

STEC pode causar desde manifestações clínicas leves até quadros severos como: colites hemorrágicas, lesão endotelial, oclusão vascular, nefrite (VILA et al., 2016) e complicações extraintestinais graves, como a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) (MAJOWICZ et al., 2014; FREEDMAN et al., 2016; NASEER et al., 2017), falência renal e trombocitopenia trombótica púrpura (TARR et al., 2005; MAYER et al., 2012). A STEC é responsável pela ocorrência de mais de dois milhões de casos de doenças agudas anualmente no mundo todo. Sendo a causa de 3890 casos de SHU, 270 casos de doença renal crônica e 230 mortes ao ano (MAJOWICZ et al., 2014).

O principal fator de virulência da STEC é a produção de toxinas Shiga, que são proteínas codificadas por genes (*stx1* e/ou *stx2*) carregados por bacteriófagos lisogênicos. Ao entrar no citoplasma, a toxina inibe a síntese proteica levando a apoptose. As cepas *stx2* positivas, principalmente do subtipo *stx2EDL933*, são potencialmente mais virulentas e mais frequentemente relacionadas a SHU, do que aquelas que possuem somente o gene *stx1* (HUNT, 2010; ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013).

STEC podem ser encontradas no TGI de várias espécies de animais domésticos e selvagens, no entanto os bovinos são considerados os principais reservatórios (SAEEDI et al., 2017; MUGHINI-GRAS et al., 2018). Esses e as STEC possuem uma relação simbiótica, o que faz com que os bovinos sejam portadores assintomáticos, tornando-os epidemiologicamente relacionados à maioria dos surtos em humanos (SAEEDI et al., 2017).

Em estudo de revisão sobre o papel do bovino na infecção por STEC em humanos, Hussein e Bollinger (2005) demonstraram que a prevalência no rebanho bovino confinado

e em pastagem variou de 0,3 a 19,7% e de 0,7 a 27,3%, respectivamente, e que a prevalência de STEC não O157 foi de 4,6 a 55,9% em bovinos confinados e de 4,7 a 44,8% em pastagem. Dos 373 sorotipos de STEC isolados nas fezes e pele de bovinos, 17,4% foram detectados em pacientes com SHU e 16,6% são conhecidos por causarem outras doenças em humanos. Já a prevalência de STEC em carcaças inteiras de bovinos variou de 0,01 a 43,4% e a prevalência de STEC não O157 foi de 1,7 a 58%. Dos 162 sorotipos de STEC em produtos de carne bovina, 26,5% foram detectados em pacientes com SHU e 22,2% são conhecidos por causarem outras doenças em humanos.

Recentemente, Mughini-Gras et al. (2018) demonstraram que o bovino é a principal fonte de infecção de STEC sendo responsável em média por 51% dos 1183 casos em humanos. Os autores também verificaram que o consumo de preparados à base de carne crua bovina e carne bovina aumentaram em 1,65 e 1,61 as chances de infecção por STEC, respectivamente.

EPEC são frequentemente associadas à diarreia acometendo crianças, principalmente nos países em desenvolvimento. Em 1995, EPEC foi classificada em duas subcategorias: EPEC típica (EPEC-t) e atípica (EPEC-a). EPEC-t são identificadas pela presença do gene *eae* (*E. coli attaching and effacing*) e do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), com comportamento epidemiológico restrito aos seres humanos e patogenicidade bem definida. Entretanto, EPEC-a além de estar associada à diarreia humana, pode ser encontrada em diversos animais, alimentos e estar presente tanto em ambientes aquáticos, como terrestres. Estas também apresentam o gene *eae*, porém são desprovidas do plasmídeo EAF que codifica a adesina *type IV bundleforming pilus* (BFP) (CLEARY et al., 2004; GIRON et al., 1991; MOXLEY; SMITH, 2010; SOUZA et al., 2016).

O principal mecanismo de patogenicidade da EPEC consiste na lesão conhecida por *attaching-effacing* (lesão A/E), que se caracteriza pela destruição de microvilosidades, adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal e a agregação de actina polarizada e de outros componentes do citoesqueleto nos locais de fixação da bactéria, resultando na formação característica do pedestal (HUNT, 2010; ETCHEVERRÍA; PADOLA, 2013).

Salmonella spp. também é uma das principais causas de doença entérica em humanos associada ao consumo de carne bovina, podendo causar desde quadros de gastroenterite leve até manifestações graves (CUMMINGS et al., 2016; SMITH, 2016). Nos EUA, entre 1973 a 2011, foi responsável por 96 surtos, 3684 doenças, 318 internações e cinco mortes associadas à carne bovina (LAUFER et al., 2015). No Brasil, entre 2000 a 2017, foi o agente mais frequentemente identificado em surtos de doenças transmitidas por

alimentos sendo responsável por aproximadamente 30% dos surtos com identificação do agente etiológico (N = 2593) (BRASIL, 2018).

Salmonella spp. possui mais de 2500 sorotipos, sendo o Typhimurium e Enteritidis os mais frequentes em infecções humanas e que também podem ser isolados de vários hospedeiros, inclusive bovinos (ANDINO; HANNING, 2015; ENG et al., 2015; BARLOW et al. 2015; SMITH, 2016; IGLESIAS et al., 2017). Estudos reportaram que a prevalência de *Salmonella* spp. nas fezes de bovinos varia de 9 a 22% (BOSILEVAC et al., 2015; COURA et al., 2015; BARLOW et al. 2015; DARGATZ et al., 2016;) enquanto que na carcaça de 0,5 a 9% (MATOS et al., 2013; COSSI et a., 2014; IGLESIAS et al., 2017). A importância do bovino como veículo de *Salmonella* spp. para humanos foi demonstrada por Mughini-Gras et al. (2014) em revisão sistemática envolvendo estudos de caso-controle, os quais verificaram que o bovino foi responsável por 6,2% dos 2944 casos de salmonelose humana ocorridos na Holanda entre 2002 a 2003 e que o consumo de carne crua e mal cozida de bovino aumentava em 9,4% as chances de ocorrência de salmonelose.

Os principais fatores de virulência relacionados à excreção de *Salmonella* spp. nas fezes de bovinos são: 1) Expressão de adesinas (fímbrias, *pili*, flagelo, lipopolissacarídeo e cápsula), proteínas que se ligam as células do hospedeiro, responsáveis pelo aumento da carga microbiana no TGI; 2) Proteínas efetoras (*ShdA* e *MisL*) relacionadas à sobrevivência no TGI; 3) Formação de biofilmes, associado principalmente com a duração da eliminação e quantidade de *Salmonella* spp. excretada nas fezes (GOPINATH et al., 2012).

Durante o abate bovino, a pele contaminada com sujidades e fezes é a principal fonte de contaminação para a carcaça (BRICHTA-HARHAY et al., 2008; KOOHMARAIE et al., 2012; NIYONZIMA et al., 2015). Koohmaraie et al. (2012), ao avaliarem bovinos no momento do abate, verificaram que 96% (N = 100) das amostras de pele foram positivas para *Salmonella* spp. Semelhante aos achados de Brichta-Harhay et al. (2008) nos EUA e Bosilevac et al. (2015) na Arábia Saudita, os quais reportaram prevalência de 89,6% e 80,2%, respectivamente.

Ainda que estratégias de controle e redução de *Salmonella* spp. na superfície da carcaça tenham se mostrado eficazes (YOUNG et al., 2016), é frequente a ocorrência de surtos de salmonelose envolvendo o consumo de carne moída bovina. Nos EUA, entre 2002 a 2011, a carne moída foi responsável por 45% (N = 38) dos surtos de salmonelose atribuídos à carne bovina (LAUFER et al., 2015). Esses surtos estão relacionados, principalmente, com a capacidade de sobrevivência do agente no sistema linfático periférico. Uma vez que na rotina de abate não é possível remover todos os linfonodos,

esses constituem importante fonte de contaminação para a carne moída (LI et al., 2015; WEBB et al., 2017; VOHRA et al., 2018).

Li et al. (2015), ao avaliarem o risco relativo do sistema linfático sobre a contaminação da carne moída, verificaram que em média mais de 90% da carga de *Salmonella* spp. na carne moída provêm da contaminação por linfonodos periféricos maiores. Estudos reportam que o principal mecanismo de entrada da *Salmonella* spp. no sistema linfáticos de bovinos ocorre pela pele por meio de lesões cutâneas ou pela picada de insetos (GRAGG et al., 2013; EDRINGTON et al., 2013; OLAFSON et al., 2016).

Um aspecto importante em relação à *Salmonella* spp. e STEC em bovinos, diz respeito a animais conhecidos como *high-shedders* e *super-shedders* (CALLAWAY, 2010; GOPINATH et al., 2012; FSIS-USDA, 2014; WILHELM et al., 2017). Nos EUA existe uma preocupação com a identificação e o controle desses bovinos que são responsáveis por altas prevalências e transmissão de STEC no rebanho. Esses animais são caracterizados, respectivamente, por excretarem mais de 10^2 e 10^4 UFC/g nas fezes de um dos sete principais sorotipos de STEC (O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 e O145) (ARTHUR et al., 2010; CALLAWAY et al., 2013). Quanto a *Salmonella* spp., bovinos *super-shedders* foram caracterizados por excretarem de 10^3 a 10^5 UFC/g de *S. dublin* durante 400 dias (GOPINATH et al., 2012).

Não há um consenso científico sobre quais mecanismos estão relacionados com o aumento dessa excreção, acredita-se que a formação de biofilmes no epitélio intestinal seja responsável pela duração da excreção, quantidade de patógenos eliminada e característica intermitente desses animais (GOPINATH et al., 2012; MUNNS et al., 2015). A importância de animais *super-shedders* na contaminação da carcaça é devido à influência que exercem na taxa de transmissão entre animais e nos níveis de colonização, principalmente durante o período pré-abate (ARTHUR et al., 2010). Esses fatores são determinantes para a contaminação da pele, que conforme citado anteriormente, é considerada a principal fonte de contaminação para a carcaça (ARTHUR et al., 2007; CALLAWAY et al., 2010; WHEELER et al., 2014).

A contaminação da carcaça bovina por patógenos está condicionada a uma série de eventos que se estendem desde o animal no campo até as etapas de processamento pós-abate. Portanto, conhecimento das características epidemiológicas desses patógenos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle em todos os níveis da cadeia produtiva.

2.5 Estratégias para redução de patógenos na carne bovina *in natura*

Desde 1990, os EUA têm atuado para reduzir o risco de agentes patogênicos na carcaça bovina e seus produtos (WHEELER et al., 2014). Esses trabalhos foram intensificados devido ao surto de *E. coli* O157:H7 ocorrido entre 1992 e 1993, envolvendo hambúrguer de uma rede de *fast-food* (CDC, 1993). A partir desse momento, a indústria da carne e o governo dos EUA investiram milhões de dólares em pesquisas focadas em estratégias de controle de *E. coli* O157:H7 (WHEELER et al., 2014) e *Salmonella* spp. (HANSON et al., 2016; YOUNG et al., 2016; ZAMORA-SANABRIA; ALVARADO, 2017).

Desde então, estratégias de controle e redução de patógenos têm sido adotadas com sucesso durante o pós-abate. Entretanto, intervenções em nível de campo e no período pré-abate ainda são um desafio devido à falta de incentivo financeiro aos produtores e dificuldade de controlar todas as variáveis que podem influenciar na ocorrência de patógenos em rebanhos bovinos (WHEELER et al., 2014).

A sazonalidade é um dos principais fatores associado com a excreção e disseminação de patógenos no rebanho (VENEGAS-VARGAS et al., 2016; WEBB et al., 2017). Portanto, medidas de prevenção e controle devem ser intensificadas durante os meses quentes do ano (CALLAWAY, 2010; FSIS-USDA, 2014; ZAMORA-SANABRIA; ALVARADO, 2017).

De forma geral, boas práticas agropecuárias como a manutenção de ambiente limpo, seco e com sistema de drenagem de resíduos adequado, assim como a oferta de água e alimentos seguros, livres de contaminantes, constituem intervenções básicas de controle a serem adotadas na propriedade rural (CALLAWAY, 2010; FSIS-USDA, 2014; HANSON et al., 2016; ZAMORA-SANABRIA; ALVARADO, 2017). Além disso, restringir o acesso de animais de outras espécies no ambiente de produção é fundamental para promover a biossegurança e garantir a saúde e bem-estar dos animais (CALLAWAY, 2010; FSIS-USDA, 2014; WILHELM et al., 2017).

Devido a fatores imunológicos, bezerras e novilhos apresentam maior taxa de excreção de patógenos do que animais adultos, assim, recomenda-se a segregação do rebanho por idade (MIR et al., 2016).

Durante o período pré-abate, algumas situações estressantes como o tempo de jejum (POINTON et al., 2012), transporte e permanência nos currais de abate (BARHAM et al., 2002; ARTHUR et al., 2007) estão associadas à maior colonização e multiplicação de patógenos no TGI. Além disso, estas etapas ocorrem em locais com alta densidade de

animais, o que potencializa a contaminação cruzada pela pele (CUMMING et al., 2009; BENJAMIN et al., 2015). Portanto, essas etapas devem ocorrer no menor tempo possível, sobretudo, com o objetivo de garantir o bem-estar animal e assegurar a inocuidade da carcaça e produtos cárneos (FSIS-USDA, 2014).

Patógenos Gram-negativos, como STEC são sensíveis a maior concentração de AGV e à redução do pH, que resultam da fermentação microbiana. Portanto, estratégias de exclusão baseadas em manejos e uso de aditivos alimentares que alterem esses fatores físico-químicos podem influenciar na excreção de patógenos. Inúmeros aditivos alimentares podem ser usados como medida de exclusão, tais como probióticos, colicinas antimicrobianas, clorato de sódio, antibióticos, produtos cítricos, ácidos orgânicos, plantas ricas em compostos fenólicos, taninos, óleos essenciais e o extrato de alga marrom (*Ascophyllum nodosum*) (CALLAWAY et al., 2013; FSIS-USDA, 2014; WHEELER et al., 2014).

O uso de probióticos, além de melhorar o desempenho produtivo dos animais, têm apresentado resultados promissores na redução de patógenos. Os principais mecanismos de atuação desses aditivos ocorrem através da exclusão competitiva e pela produção de compostos originados da fermentação microbiana que são considerados tóxicos para os patógenos, como ácidos orgânicos e bacteriocinas (WISENER et al., 2015; UYENO, et al., 2015).

Estratégias pré-abate antimicrobianas diretas incluem a descontaminação da pele, vacinação (CALLAWAY, 2010; FSIS-USDA, 2014; WHEELER et al., 2014; WILHELM et al., 2017) e uso de bacteriófagos (SHARMA, 2013; CALLAWAY, 2013; FSIS-USDA, 2014; WHEELER et al., 2014).

A vacinação de bovinos tem sido incentivada em diversos países. Ela atua através da formação de anticorpos no TGI dos bovinos contra estruturas específicas dos patógenos. Nos EUA existem diversas opções comerciais de vacinas contra *E. coli* O157:H7 baseadas na tecnologia *Siderophore Receptor and Porin* (SRP), que inibem o acesso da bactérias ao ferro que é requerido por essas em inúmeros processos biológicos, como a replicação (CALLAWAY, 2010; FSIS-USDA, 2014; WHEELER et al., 2014; WILHELM et al., 2017).

Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias específicas. Podem ser fornecidos na dieta ou aplicados sobre a pele dos animais. Nos frigoríficos, podem ser aspergidos sobre a pele dos bovinos nos currais de abate, corredores ou no boxe de insensibilização (SHARMA, 2013; CALLAWAY, 2013; FSIS-USDA, 2014; WHEELER et al., 2014).

2.6 Considerações finais

Diante do conteúdo exposto, o desenvolvimento de estratégias de controle e redução de patógenos deve ser baseado em uma abordagem multi-obstáculos (*multi-hurdle approach*), que englobe intervenções desde o animal vivo até as etapas de processamento pós-abate. Alinhado com este princípio, este estudo enseja produzir conhecimento técnico e científico que permita o uso adequado do WDG como ferramenta de controle na excreção de patógenos nas fezes de bovinos confinados no Brasil. Uma vez que, ao diminuir a quantidade de patógenos carreados pelos bovinos para a sala de abate consequentemente ocorrerá redução de contaminação na carcaça e seus produtos (FSIS-USDA, 2014; MOXLEY et al., 2015; HANSON et al., 2016).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse projeto foi determinar a excreção de patógenos e a inocuidade da carcaça de bovinos cruzados (F1 Angus x Nelore) submetidos a dietas com alto teor de energia e com diferentes níveis de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

As hipóteses foram:

- 1) Devido a menor taxa de fermentação no intestino grosso, os animais alimentados com as dietas contendo 30 e 45% de silagem de WDG apresentarão maior excreção fecal de patógenos do que os alimentados com a dieta contendo 15% do coproduto;
- 2) Devido a maior taxa de fermentação de amido no intestino grosso, os animais do grupo controle (0% de silagem de WDG) apresentarão menor excreção de patógenos nas fezes em relação aos animais alimentados com 15, 30 e 45% do coproduto;
- 3) A contagem de mesófilos nas carcaças não irá diferir entre os tratamentos avaliados;
- 4) A ocorrência e contagem de coliformes totais e *E. coli* não patogênica serão maiores nas carcaças dos animais alimentados com as dietas contendo 30 e 45% de silagem de WDG, em relação aos animais alimentados com as dietas contendo 0 e 15% do coproduto;
- 5) A maior excreção fecal de patógenos resultará em maior ocorrência desses patógenos nas carcaças.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

O presente estudo é um subprojeto do projeto “Níveis de grãos de destilaria em dietas para bovinos de corte confinados: desempenho, características de carcaça e qualidade de carne” aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ, UNESP - Botucatu (protocolo 67/2017), com resultados parciais publicados e apresentados no Anexo 1. O estudo foi conduzido no confinamento experimental do Departamento de Melhoramento de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP – Botucatu/SP, no período de junho de 2017 a novembro de 2017.

Foram selecionados 100 bovinos machos não castrados, F1 Angus \times Nelore, com peso inicial médio de 369,9 kg, idade de 1 ano e 6 meses. Os animais foram mantidos em baias com piso de concreto, com dimensionamento 5 por 6 metros, contendo bebedouro tipo concha e uma área de cocho de 5 m. A taxa de lotação foi de cinco animais por baia (Figura 2 e Figura 3).



FIGURA 2. Animais experimentais no primeiro dia de confinamento



FIGURA 3. Animais experimentais após 132 dias de confinamento

O armazenamento do WDG foi realizado em “silos-bolsa” com aplicação aditivo biológico *Feedtech™ Silage F600* (DeLaval), conforme recomendações do fabricante (Figura 4).



FIGURA 4. Armazenamento do grão úmido de destilaria em silos-bolsa e aplicação de inoculante *Feedtech™ F600*.

Quatro diferentes dietas foram utilizadas, contendo 0, 15, 30 ou 45% de silagem de WDG. Os animais foram distribuídos em baias coletivas (5 animais por baia), sendo utilizadas 5 baias por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados e o fator de blocagem foi o peso corporal inicial. Foram utilizados cinco blocos, sendo que em cada bloco foram realizadas cinco repetições por tratamento.

Após o alojamento nas baias, foi realizada a atribuição aleatória dos tratamentos. Nos primeiros cinco dias, os animais foram alimentados *ad libitum* com feno de Tifton-85 picado e 1,2 kg de farelo de soja. Posteriormente, teve início o protocolo de adaptação, utilizando o modelo *Step-up*, às dietas com alto teor de energia (Tabela 1). O período de adaptação teve duração total de 22 dias, sendo sete dias alimentados com a dieta denominada Adap e cinco dias com cada uma das dietas denominadas *Step 1*, *Step 2* e *Step 3*. Durante a adaptação, os animais que seriam submetidos na terminação, aos níveis de 15, 30 e 45% de silagem de WDG, receberam somente 6,5% do alimento na MS da dieta, o qual foi incluído em substituição ao milho. Portanto, os níveis de inclusão de milho nas dietas com WDG foram reduzidos em 6,5% em relação à dieta sem WDG demonstradas na Tabela 2, sendo 41,11% na Adap, 50,48% na *Step 1*, 57,74% na *Step 2* e 63,58% na *Step 3*.

TABELA 1. Ingredientes das dietas oferecidas no período de adaptação

Ingredientes (% da material seca)	Adap	Step 1	Step 2	Step 3
Concentrado (%)	59,39	68,48	75,76	81,19
Feno	40,61	31,52	24,24	18,81
Milho	47,61	56,98	64,24	70,08
Farelo de Soja	8,84	8,56	8,58	8,17
Núcleo mineral vitamínico ¹	2,94	2,94	2,94	2,94

¹ Composição: Ca (mín) 190,00 g/Kg, Ca (máx) 200,00 g/Kg, P (mín) 16,00 g/Kg, S (mín) 19,00 g/Kg, Mg (mín) 15,00 g/Kg, Na (mín) 45,00 g/Kg, Fe (mín) 286,00 mg/Kg, Cu (mín) 428,00 mg/Kg, Mn (mín) 1285,00 mg/Kg, Zn (mín) 1715,00 mg/Kg, I (mín) 25,00 mg/Kg, Co (mín) 8,60 mg/Kg, Se (mín) 5,70 mg/Kg, Cr (mín) 6,60 mg/Kg, NNP. Eq. PB 324,00 g/kg, Monensina 945,00 mg/Kg, *Saccharomyces Cerevisiae* 85,50 UFC/kg, Vit. A 86,00 KUI/kg, Vit. D 11,50 KUI/kg e Vit. E.

Após período de adaptação teve início o período de terminação, no qual os animais foram submetidos às dietas demonstradas na Tabela 2. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, sendo o primeiro fornecimento de dieta às 10h00 e o segundo às 17h00. Após 132 dias de experimento, os animais foram abatidos em um frigorífico localizado no estado de São Paulo, sob inspeção federal (BRASIL, 2017).

TABELA 2. Ingredientes e conteúdo nutricional das dietas oferecidas no período de terminação

	Tratamentos (% WDG ¹)			
	0	15	30	45
Ingredientes (% MS²)				
Bagaço de cana	7,16	7,11	7,11	7,11
Feno de Tifton-85	4,20	4,20	4,20	4,20
Milho moído	74,89	65,27	52	38,73
Farelo de Soja	10,33	4,77	2,93	1,09
Silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	-	15	30	45
Cloreto de Potássio	-	0,23	0,34	0,45
Núcleo mineral vitamínico ³	3,42	3,42	3,42	3,42
Conteúdo nutricional (% MS²)				
Proteína bruta	14,84	16,18	19,11	22,04
Fibra em detergente neutro	16,22	23,45	30,82	38,2
Fibra em detergente neutro-volumoso	9,05	9,00	9,00	9,00
Extrato etéreo	3,42	3,57	3,63	3,69
Carboidrato não fibroso	62,76	54,04	43,43	32,83
ELg (Mcal/Kg MS) ⁴	1,30	1,29	1,27	1,26

¹ *Wet Distillers Grains*

² Conteúdo nutricional em porcentagem da matéria seca estimado pelo software da Cargill.

³ Composição: Ca (mín) 190,00 g/Kg, Ca (máx) 200,00 g/Kg, P (mín) 16,00 g/Kg, S (mín) 19,00 g/Kg, Mg (mín) 15,00 g/Kg, Na (mín) 45,00 g/Kg, Fe (mín) 286,00 mg/Kg, Cu (mín) 428,00 mg/Kg, Mn (mín) 1285,00 mg/Kg, Zn (mín) 1715,00 mg/Kg, I (mín) 25,00 mg/Kg, Co (mín) 8,60 mg/Kg, Se (mín) 5,70 mg/Kg, Cr (mín) 6,60 mg/Kg, NNP. Eq. PB 324,00 g/kg, Monensina 945,00 mg/Kg, *Saccharomyces Cerevisiae* 85,50 UFC/kg, Vit. A 86,00 KUI/kg, Vit. D 11,50 KUI/kg e Vit. E.

⁴ Energia Líquida de ganho

4.2 Colheita de amostras

4.2.1 Suabe da junção reto anal e colheita das fezes

Os animais foram individualmente contidos em tronco de contenção. Para análise qPCR qualitativa de STEC e *Salmonella* spp., as amostras foram colhidas por meio da técnica de suabe da mucosa reto anal (AGGA et al., 2016; AGGA et al., 2017), utilizando uma luva de procedimento por animal. Cada suabe foi armazenado em tubo de ensaio contendo meio de transporte Cary Blair (CB) (Laborclin) (ALEXANDER et al., 2009). As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas em temperatura de refrigeração até 4 °C e transportadas para o Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC/IBB/UNESP) - Botucatu, SP, onde foram processadas em até 24 horas.

Para análise físico-química, amostras de fezes de cada animal foram colhidas do piso do curral logo após defecação e acondicionadas em embalagens plásticas. As

embalagens foram armazenadas em caixa isotérmicas e transportadas para o Laboratório do Departamento de Economia, Sociologia e Tecnologia (DEST/FCA/UNESP) - Botucatu, SP, onde foram mantidas congeladas até realização das análises.

4.2.2 Esponja de carcaça

A amostragem das meias carcaças esquerdas foi realizada dentro da câmara de resfriamento logo após o abate, utilizando método não destrutivo por esponja, conforme instruções da ISO 17604:2015 (ISO, 2015).

Foram amostradas quatro regiões de cada meia carcaça esquerda como se segue: 100 cm² da superfície do coxão, 100 cm² da superfície do flanco, 100 cm² da superfície do peito e 100 cm² da superfície do pescoço, totalizando 400 cm². Para cada amostragem, foi utilizada uma luva estéril, um guia estéril para amostragem de 100 cm² (Interlab) e uma esponja umedecida estéril (3M).

4.3 Análises microbianas

Todas as análises microbianas, convencionais e moleculares, foram realizadas no LDM-IBTEC/IBB/UNESP – Botucatu, SP.

4.3.1 Indicadores higiênicos e sanitários na carcaça

As amostras de carcaça foram adicionadas de 15 mL de solução, para obtenção do volume final de 25 mL de solução contendo 0,1% de peptona (LP0037, Oxoid) e 0,85% de NaCL (Dinâmica) (SSP 0,1%), conforme recomendações da ISO 17604:2015 (ISO, 2015). Todas as amostras foram homogeneizadas por 60 segundos a 160 batidas por minuto em equipamento de homogeneização de amostras (Máy Dâp Mầu Vi Sinh Seward Stomacher 400 Circulator).

As amostras foram individualmente submetidas à diluição seriada decimal utilizando SSP 0,1% estéril, seguido de plaqueamento de até três diluições em placas Petrifilm (3M). Todas as amostras (N = 97) foram analisadas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, ocorrência e contagem de *E. coli* não patogênica e de coliformes totais de acordo com os métodos descritos pelo *Official Methods of Analysis* (AOAC 990.12, AOAC 998.08 e AOAC 991.14), respectivamente (AOAC, 2012a, b e c). Os resultados foram apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC) por cm². O limite de detecção foi de 0,0625 UFC/cm².

4.4 Análises físico-químicas das fezes

As amostras colhidas conforme descrito no item 4.2.1 foram transportadas refrigeradas para o laboratório “ESALQLab” do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, para análise de determinação de ácidos graxos voláteis (AGV) (acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico), determinação de ácido lático, amido, proteína bruta (PB), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) e pH. As análises foram realizadas de acordo com metodologias descritas no Manual de Métodos de Análise de Alimentos (FEALQ) (CAMPOS et al., 2004).

4.4.1 Determinação de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA)

A determinação de FDA foi realizada de acordo com as metodologias de Goering e Van Soest (1970) e Van Soest et al. (1991), descritas no Manual de Métodos de Análise de Alimentos (FEALQ) (CAMPOS et al., 2004).

Foi pesado 1 g da amostra em duplicata. Essas foram transferidas para um béquer de 500 mL e adicionadas de 100 mL de solução de detergente neutro. Em seguida o conteúdo foi aquecido até ebulição e mantido em fervura no ebulidor de refluxo por 60 minutos. Após esse período, o conteúdo foi filtrado à vácuo em cadinhos *Gooch*, previamente tratados, com peso estabilizado em estufa a 105° C por 24 horas e resfriados em dessecador. O vácuo foi interrompido no momento da adição do filtrado no cadinho. Em seguida o filtrado foi lavado, por três vezes consecutivas, com água destilada fervente e duas vezes com acetona. O vácuo foi interrompido no momento da adição da água e acetona no cadinho.

Os cadinhos com resíduo mantidos na estufa de 105 °C foram lavados por 12 horas, resfriados em dessecador e em seguida pesados, obtendo-se o peso do resíduo (FDA) da amostra. Os resíduos dos cadinhos foram incinerados por 3 horas em mufla a 550 °C e resfriados em dessecador. Em seguida, o cadinho com as cinzas foi pesado. Os cadinhos foram retirados da mufla a 200 °C, resfriados em dessecador e pesados.

4.4.2 Quantificação de ácidos graxos voláteis (AGV)

A determinação de AGV foi realizada de acordo com as metodologias de Palmquist e Conrad (1971) e Nocek et al. (1987), descritas no Manual de Métodos de Análise de Alimentos (FEALQ) (CAMPOS et al., 2004).

Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, uma alíquota de 1

mL de fezes diluída na proporção 1:1 com água destilada foi centrifugada a 15000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida 0,8 mL do sobrenadante foram transferidos para tubo *vial* cromatográfico e adicionado 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico (25%) com ácido fórmico (98-100%) e 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno). Deste extrato, 1 µL foi injetado em cromatógrafo gasoso com as seguintes características:

- Coluna capilar HP - FFAP (19091F-112; 25 m, 0,320 mm, 0,50 µm, J&W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA).
- Temperatura do injetor e detector por ionização de chama mantida a 260° C.
- Rampa de aquecimento do forno:
 - Temperatura inicial: 80°C, mantida por 1 minuto.
 - Aumentada para 120°C em uma taxa de 20°C/min, mantida por 3 min.
 - Aumentada para 205°C em uma taxa de 10°C/min, mantida por 2 min.
 - Tempo total da corrida: 16,5 min.
- Gás de arraste: hidrogênio a 1,35 mL/min.
- No detector, os fluxos de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio (*make up*) foram mantidos a 40, 400 e 40 mL/min, respectivamente.

A concentração dos AGV (mM/L) foi determinada com base em uma curva cromatográfica de calibração externa. Para análise estatística, os dados utilizados foram transformados para proporção molar (mM/100mM), ou seja, a relação entre a quantia de um determinado AGV e o total observado.

4.4.3 Determinação de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB) e amido

O método oficial de infravermelho (NIRS) recomendado pelo *Official Methods of Analysis* foi utilizado para a quantificação de PB (AOAC, 989.03a), FDN (AOAC, 973.18b) e amido (AOAC, 991.01c) (AOAC, 1990a; 1995 a e b). A calibração foi desenvolvida pelo *Dairy One Forage Lab* (Ithaca, NHY, EAU) e validada com lote de amostras independentes de vários locais do Brasil.

4.4.4 Determinação de ácido láctico

As concentrações de ácido láctico total foram determinadas pela técnica colorimétrica descrita por Pryce (1969).

Em tubos de ensaio contendo 3,95 mL de reagente precipitante [(10 g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}$) + 22 mL de ácido ortofosfórico 90% (H_3PO_4) + 5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 1 L de água destilada)] foram colocados 50 μL de fezes, e foram agitados por aproximadamente 5 segundos e centrifugados por 5 minutos a 2000 x g. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e, de forma rápida, 6 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adicionados em cada tubo, sendo novamente agitados por 10 segundos. Após a agitação, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionados 100 μL de reagente de coloração (1,5 g de p-hidroxibifenil em 100 mL de dimetilformamida, em balão de 100 mL), agitados e deixados em repouso por 10 minutos.

Na etapa seguinte, os tubos foram transferidos para banho-maria com água fervente por 90 segundos, resfriados em água corrente e levados a espectrofotômetro para leitura de absorbância utilizando-se filtro de comprimento de onda de 565 nm. As soluções padrão foram obtidas através de diluição seriada da solução inicial de 4,0 mg/dL (2,13 g de lactato de lítio + 5 mL de H_2SO_4 + 500 mL de água destilada) e utilizadas na construção de curva padrão com as concentrações de 0; 0,25; 0,50 e 1,0 mg/mL.

4.4.5 Determinação do pH

Uma alíquota da amostra (4 g) foi acrescida de 4 mL de água deionizada. O material foi homogeneizado e posteriormente utilizado um potenciômetro para mensuração do pH fecal, conforme metodologia descrita por Channon et al. (2004).

4.3.2 Preparo das alíquotas para análises moleculares

4.3.2.1 Esponja de carcaça

Uma alíquota de 10 mL de cada esponja de carcaça mantidas em SSP 0,1% foi enriquecida com 50 mL de Caldo Soja Trypticaseína modificado (CM0989, Oxoid) (TSBm), seguido de homogeneização em equipamento de homogeneização de amostras e incubado a 36 ± 1 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Uma alíquota de 1500 μL da cultura enriquecida foi armazenada em microtubos a -20 °C até realização das análises moleculares.

4.3.2.2 Suabe da junção reto anal

Para análise de Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) de STEC e *Salmonella* spp. foram realizados os seguintes procedimentos: em embalagem estéril, o suabe de cada amostra mantido em meio de transporte CB, foi transferido para tubos contendo 10 mL de

TSBm, seguido de homogeneização em equipamento de homogeneização de amostras e incubado a 36 ± 1 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Após esse período, uma alíquota de 1500 µL da cultura pré-enriquecida foi armazenada em microtubos de 2 mL (duplicata) a -20 °C até realização das análises moleculares qualitativas de STEC (COOLEY et al., 2013).

Para análise de *Salmonella* spp., 1 mL da amostra pré-enriquecida em TSBm foi transferido para tubo de ensaio com tampa de rosca contendo 9 mL de caldo Tetracionado (CM0343B, Oxoid) suplementado com novabiocina (SR0181E, Oxoid) (TT+n) e adicionado de 200 µL de solução de iodo aproximadamente 30 minutos antes do uso, conforme as recomendações do fabricante. A solução de iodo foi composta por 0,30% de iodo ressublimado (Iodine Emsure[®]-Merck) e 0,25% de iodeto de potássio (Potássio Iodeto PA-Synth).

Os tubos de TT+n, foram incubados por 18 horas a 42 ± 2 °C em banho-maria (AGGA et al., 2016; GOODMAN et al., 2017; HANLON et al., 2018). Após período de incubação, uma alíquota de 1500 µL do cultivo em TT+n foi armazenada em microtubos de 2 mL (duplicata) a -20 °C até realização das análises moleculares qualitativas de *Salmonella* spp.

4.3.3 Análises moleculares

4.3.3.1 Gene normalizador da etapa de extração do DNA

O gene *16S* foi utilizado como gene normalizador da etapa de extração da análise molecular, para validação da técnica de extração, conforme descrito no item 4.3.3.2. Utilizando análise de qPCR conforme descrito no item 4.3.3.4, foram aceitas somente as extrações positivas, ou seja, ≥ 10 cópias/µL do gene *16S* no DNA extraído.

4.3.3.2 Extração do DNA das amostras

O protocolo baseado na metodologia descrita por Giraffa et al. (2000) foi adotado para a extração do DNA das amostras de suabe da junção reto anal e de esponja de carcaça mantidas em meios de cultura (TT+n e TSBm). Em resumo, 1,5 mL foram transferidos para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 10000 x g durante 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução *Phosphate Buffered Saline*, pH 7,4 - 0,01 M (PBS) e centrifugado novamente a 10000 x g por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 185 µL de PBS e adicionado de 200 µL de solução a 10% de Chelex[®] 100 (BIO RAD).

A amostra foi homogeneizada e aquecida em equipamento “ThermoMixer” (Eppendorf™ ThermoMixer™ C) a 100 °C e 500 RPM por 10 minutos. Após esse período, foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos e duas alíquotas de 100 µl do sobrenadante foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL e congeladas a -20 °C até análises de qPCR qualitativa.

4.3.3.3 Controles positivos

Os controles positivos usados nas análises moleculares foram preparados no Laboratório de Patogenicidade Bacteriana - DMI/IBB/UNESP, Botucatu, SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Rodrigo Tavanelli Hernandez e Prof^a. Dr^a. Vera Lúcia Moraes Rall.

Em síntese, a cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (positiva para o gene *ttr*) foi repicada em 5 mL de Brain Heart Infusion (BHI) e o cultivo foi incubado a 37 °C por 24 horas. Após esse período 200 µL do cultivo em BHI foi transferido para um tubo contendo 9000 µL de solução salina 0,85% para realização do teste de turbidez através da escala de McFarland (MCFARLAND, 1907) utilizando o tubo de escala 0,5 que corresponde a $1,5 \times 10^8$ células/mL. A concentração do cultivo original foi de $6,9 \times 10^9$ células/mL. Alíquotas de 290 µL (2×10^9 células) foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* obtidos foram congelados a -20 °C.

Para controle positivo de *E. coli* O157:H7 foi utilizada a cepa EDL - 933 de *E. coli* O157:H7 (positiva para os genes *eae*, *stx₁* e *stx₂*) ATCC 43895. Essa foi repicada em 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubada a 37 °C por 24 horas. Com base na leitura de 1087 do espectrofotômetro na densidade óptica (Pharmacia Biotech, Ultrospec 2000) de absorbância a 600nm, a concentração de células bacterianas foi de $8,7 \times 10^8$ células/mL. Esse cálculo foi realizado através da calculadora de “*Bacterial cell number (OD600)*” (LABTOOLS, 2018). Alíquotas de 230 µL (2×10^8 células) foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* obtidos foram congelados a -20 °C.

Ambos *pellets* (ATCC 13076 e ATCC 43895) foram descongelados em refrigeração, adicionados de 300 µL de PBS e tiveram o DNA extraído utilizando o kit “*illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare*”, com o protocolo “*Protocol for the purification of genomic DNA from 50-300 µl whole blood and its cell fractions*”. Estes extraídos foram utilizados na elaboração de curvas padrão com diluições seriadas de 1:10, até se obter a concentração de 1×10^3 cópias/ml (ou 1×10^0 cópias/µl). Estas curvas

padrão foram utilizadas na padronização das análises de qPCR e determinação da diluição *endpoint* de cada controle positivo (ATCC 13076 e ATCC 43895).

4.3.3.4 Análise qPCR qualitativa

Todas as análises de Reação em Cadeia da Polimerase qualitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) com o 7500 Software v.2.3 (Applied Biosystems).

A mistura de reação final foi de 20 µL, sendo composta por: 10 µL de GoTaq® qPCR *Master Mix* (Promega) e 4,0 µL de amostra (DNA extraído). A concentração dos iniciadores (*primers*) dessalinizados (Sigma-Aldrich®) dependeu do gene alvo (Tabela 3).

A programação utilizada foi de 94 °C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido por 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 60 segundos (transcrição). Sendo ao final, determinada a curva de dissociação (*melting*), por meio da detecção da fluorescência do *SYBR Green* (intercalante de DNA) durante aumento gradual de temperatura entre 60 e 95 °C.

Cada análise de qPCR foi composta por aproximadamente 45 amostras, em duplicata, mais duas diluições com fluorescência detectável (*endpoint*) do controle positivo, em duplicata, assim como, duplicata do controle negativo, composto por água *Nuclease-Free* (Promega).

TABELA 3. Descrição dos *primers* utilizados

Parâmetros	Sequência <i>primer</i> (5' - 3')	Tamanho do <i>amplicon</i>	Referência	Concentração
Gene <i>eae</i> (<i>E. coli</i> EPEC)				
<i>Forward primer</i>	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	189pb	Hardegen et al. (2010)	0,25 µM
<i>Reverse primer</i>	CCT AAA CGG GTA TTA TCA CCA GA			
Gene <i>stx</i> ₁ (<i>E. coli</i> STEC)				
<i>Forward primer</i>	CATCGCGAGTTGCCAGAAT	72pb	Cooley et al. (2001)	0,30 µM
<i>Reverse primer</i>	TCCCACGGACTCTTCCATCT			
Gene <i>stx</i> ₂ (<i>E. coli</i> STEC)				
<i>Forward primer</i>	GATGTTTATGGCGGTTTTATTTGC	83pb	Feng et al. (2018)	0,15 µM
<i>Reverse primer</i>	TGGAAAACCTCAATTTTACCTTTAGCA			
Gene <i>ttr</i> (<i>Salmonella</i> spp.)				
<i>Forward primer</i>	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	95pb	Malorny et al. (2004)	0,25 µM
<i>Reverse primer</i>	AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC			
Gene 16S ¹				
<i>Forward primer</i>	AGTACGGCCGCAAGGTAAA	113pb	Este estudo	0,25 µM
<i>Reverse primer</i>	CAGCATGTCAAGGCCAGGTA			

¹Gene Normalizado

Para garantir a especificidade, as amostras com pico de dissociação (T_m) fora da variação ± 1 °C em relação ao T_m médio do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo em questão. Com relação à sensibilidade, o C_t (*cycle threshold*) das reações foi obtido a partir do *threshold level* estabelecido automaticamente pelo programa para cada análise. Assim sendo, as amostras com C_t maior que o C_t *endpoint* do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo. A sensibilidade dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foi de ≥ 10 cópias/ μ L, enquanto que para o gene *ttr* foi de ≥ 100 cópias/ μ L do DNA extraído.

4.5 Processamento estatístico

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base no teste de diferença entre proporções, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo. Os cálculos foram realizados supondo-se um nível α de 0,05, poder estatístico de 0,8, proporção esperada de STEC em amostras de carcaça de 20% no tratamento com 0% de WDG e de 13, 7 e 4% nos tratamentos contendo 15, 30 e 45% de WDG, respectivamente. Com base nessas suposições seriam necessárias no mínimo 64 amostras de carcaça em cada grupo de tratamento (Tabela 4). Entretanto, como esse estudo foi delineado para a pesquisa de outras variáveis, foram usados 25 animais por grupo de tratamento. Os cálculos foram realizados usando o programa estatístico *StatsToDo* (MARCHIN et al., 1997).

TABELA 4. Cálculo do tamanho da amostra baseado na ocorrência de STEC na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de grãos úmidos de destilaria (WDG)

α	<i>power</i>	Ocorrência de STEC tratamento 0% WDG	Ocorrência de STEC tratamentos com WDG	N tratamento 0% WDG	N tratamentos com WDG
0.05	0.8	20	15% WDG	13	347
0.05	0.8	20	30% WDG	7	85
0.05	0.8	20	45% WDG	4	50

O processamento estatístico dos resultados foi realizado no software estatístico SAS 9.4 TS1M2 (SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando um nível de significância de 5%, ou seja, valor $P < 0,05$.

Todas as variáveis respostas (parâmetros) foram analisadas com modelos lineares mistos (Proc Mixed) e mistos generalizados (Proc Glimmix). Os resíduos dessas análises foram avaliados quanto a normalidade e a homocedasticidade (homogeneidade da

variância), utilizando ferramentas descritivas como gráfico de dispersão de resíduos versus valores preditos (derivados do modelo estatístico construído) e os gráficos *box-plot* e histograma. Os valores de resíduos que ultrapassaram os desvios de dispersão dos dados em torno do valor 0 (zero) foram investigados e considerados *outliers* quando devido. Nenhum parâmetro analisado teve mais do que três valores desconsiderados.

Os parâmetros quantitativos (Tabelas 5, 9, 10, 11 e Anexo 2) foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento *Proc Mixed*, com “tratamento” como efeito fixo, “baia” e “peso” como efeitos aleatórios e “animal” como unidade experimental. Os parâmetros da Tabela 5 também tiveram “colheitador” como efeito aleatório. A aproximação de *Kenward-Roger* foi utilizada para ajustar os graus de liberdade. As comparações múltiplas foram ajustadas tanto com *Tukey-Kramer* como *Dunnnett* (grupo controle versus inclusões de WDG). Os parâmetros foram expressos em média dos mínimos quadrados (MMQ) e erro padrão médio (EPM).

Os dados de alguns parâmetros foram transformados com as fórmulas “ $y = \log_{10}(x)$ ” (Tabela 5), “ $y = (x+1)^{0.5}$ ” (Tabela 10 e Anexo 2) e “ $y = \log_{10}(x+1)$ ” (Tabela 11), por apresentarem melhores ajustes aos modelos propostos e utilizados. Os parâmetros das Tabelas 10, 11 e Anexo 2 foram expressos em MMQ e intervalo de confiança de 95% (IC 95%), uma vez que não é possível a transformação inversa do erro padrão (EP) (MCDONALD, 2009, 2012).

Os parâmetros com frequentes resultados abaixo do limite de detecção analítico (coliformes totais e *E. coli* nas carcaças) foram analisados de três formas: primeiro como variáveis quantitativas utilizando somente os resultados positivos obtidos. Segundo, também como variáveis quantitativas, mas utilizando todos os resultados obtidos e sendo adotado o valor de 0,0625 UFC/cm² (limite de detecção analítico) para os resultados abaixo do limite de detecção analítico (negativos) (Tabela 5). Terceiro como variáveis binárias utilizando todos os resultados, sendo presença = 1 e ausência = 0 (Tabela 4 e Figura 2).

Os parâmetros binários (Tabelas 4, 6, 7 e 8 e Figuras 2 e 3), foram submetidos à análise logística com *Odds Ratio* utilizando o procedimento *Proc Glimmix*, com “tratamento” como efeito fixo, “baia”, “peso” e “colheitador” como efeitos aleatórios e “animal” como unidade experimental. A aproximação de *Kenward-Roger* foi utilizada para ajustar os graus de liberdade. As comparações múltiplas foram ajustadas tanto com *Tukey-Kramer* como *Dunnnett* (grupo controle versus inclusões de WDG). Predição linear marginal (*noblup*) adicionada da fórmula “ $y = \exp(x) / [1 + \exp(x)]$ ” foi utilizada para calcular

as ocorrências estimadas e os respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade. A interpretação deste tipo de análise deve levar em consideração primeiro o valor de P e depois, somente se $P < 0,05$, o resultado do *Odds Ratio*.

Devido à ausência de variabilidade binária em algum dos tratamentos, os parâmetros gene *ttr* nas fezes e carcaça (sem resultados positivos), assim como, gene *stx1* na carcaça e STEC (genes *stx1* e/ou *stx2*) nas fezes (Figura 3), foram analisados pelo teste exato de Fisher utilizando o procedimento *Proc Freq*, com tabela de contingência entre “parâmetro” e “tratamento”. Estes parâmetros foram expressos em frequências absoluta e relativa, além do exato IC 95%.

5 RESULTADOS

5.1 Análises microbianas

Para análises microbianas de indicadores higiênicos e sanitários e pesquisa de STEC e *Salmonella* spp., 100 animais foram incluídos no estudo. Desses, 24 animais eram do tratamento WDG 0%, 23 do WDG 15%, 25 do WDG 30% e 25 do WDG 40%. Três não foram considerados no modelo estatístico devido a problemas de saúde, sendo dois do tratamento WDG 15% e um do WDG 0%.

5.1.2 Indicadores higiênicos e sanitários na superfície das carcaças

As ocorrências globais de coliformes e *E. coli* não patogênica nas carcaças foram de 28,9 e 24,7%, respectivamente. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a ocorrência de coliformes ($P = 0,1826$) e *E. coli* não patogênica ($P = 0,3136$) (Figura 5 e Tabela 5).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a média dos indicadores higiênicos e sanitários na superfície das carcaças (Tabela 6).

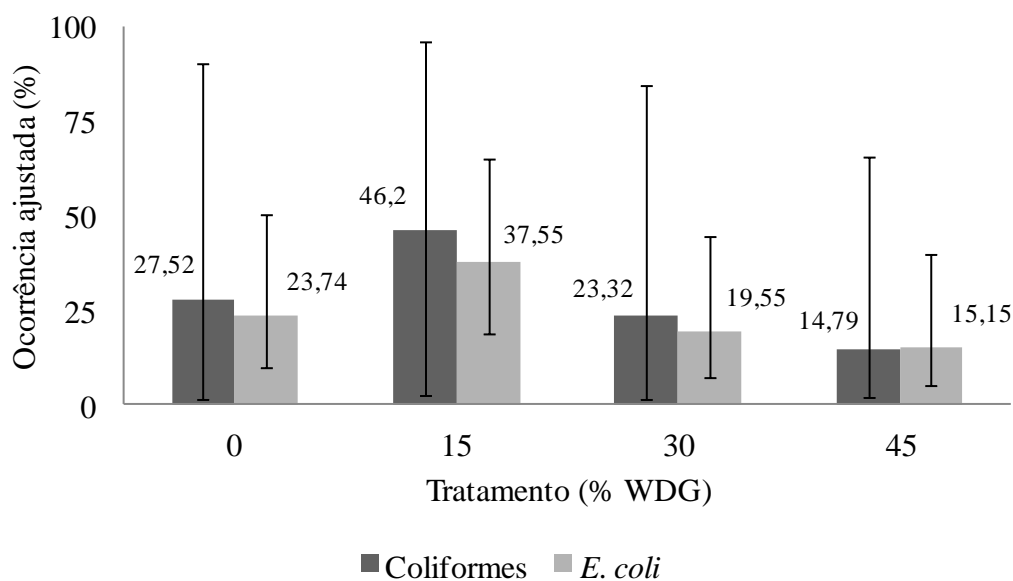


FIGURA 5. Ocorrência ajustada e IC 95% de coliformes totais e *E. coli* não patogênica na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

TABELA 5. Ocorrência ajustada e *odds ratio* de coliformes totais e *E. coli* não patogênica na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Parâmetros	Coefficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	IC 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	IC 95 % ⁵
Coliformes totais							
Intercepto	-0,97	0,70					
Tratamentos ⁶			0,1826				
WDG 0%	Referência			Referência		27,52 ^a	(1,31-90,25)
WDG 15%	0,82	0,65		2,26	(0,56-9,21)	46,2 ^a	(2,41-96,49)
WDG 30%	-0,22	0,68		0,80	(0,19-3,39)	23,32 ^a	(1,52-84,66)
WDG 45%	-0,78	0,73		0,46	(0,10-2,10)	14,79 ^a	(1,68-65,67)
<i>E. coli</i> não patogênica							
Intercepto							
Tratamentos ⁶			0,3136				
WDG 0%	Referência			Referência		23,74 ^a	(9,81-50,18)
WDG 15%	0,66	0,65		1,93	(0,54-6,97)	37,55 ^a	(18,93-64,99)
WDG 30%	-0,25	0,70		0,78	(0,20-3,11)	19,55 ^a	(7,23-44,58)
WDG 45%	-0,56	0,73		0,57	(0,14-2,44)	15,15 ^a	(5,27-39,73)

¹ Erro padrão

² *Odds ratio* derivado do modelo linear generalizado (regressão logística).

³ Intervalo de confiança de 95% do *Odds ratio*.

⁴ Ocorrência ajustada derivada do modelo linear generalizado (regressão logística).

⁵ Intervalo de confiança de 95% das ocorrências ajustadas.

⁶ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

TABELA 6. Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis avaliadas na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Variável log UFC/100cm ² *	Tratamentos (% WDG) ¹				EPM ²	Valor P
	0	15	30	45		
Aeróbios Mesófilos	3,73	4,00	3,67	3,76	0,10	0,1620
Coliformes totais						
Todas ³	1,02	0,95	0,88	0,92	0,11	0,5896
Positivas ⁴	1,55	1,13	1,15	1,54	0,24	0,2792
<i>E. coli</i> não patogênica						
Todas ⁵	0,93	0,91	0,87	0,90	0,09	0,8988
Positivas ⁶	1,31	1,08	1,15	1,41	0,27	0,7542

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Erro padrão médio.

³ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio de coliformes totais de todas as amostras de carcaça (N = 97).

⁴ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das amostras positivas para coliformes totais (N = 28).

⁵ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio de *E. coli* não patogênica de todas as amostras de carcaça (N = 97).

⁶ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das amostras positivas para *E. coli* não patogênica (N = 24).

* Unidade formadora de colônia (UFC) em 100 cm² da superfície da carcaça.

5.1.2 Ocorrência de STEC, EPEC e *Salmonella* spp. nas fezes e superfície das carcaças

O critério usado para definir se uma amostra era positiva para STEC foi quando era positiva na qPCR para os genes *stx1* e/ou *stx2*, enquanto que uma amostra foi considerada positiva para EPEC quando positiva para o gene *eae*.

As ocorrências globais e ajustadas de STEC na superfície das carcaças estão demonstradas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. As ocorrências ajustadas de EPEC na superfície das carcaças estão demonstradas na Tabela 8. As ocorrências globais e ajustadas de STEC nas fezes estão demonstradas na Figura 6 e Tabela 8, respectivamente.

A ocorrência do gene *stx1* na superfície das carcaças não foi apresentada na Tabela 8, pois o modelo estatístico não convergiu, sendo que a ocorrência foi de 8,33% (2/24) (IC 95% 0-0,19) no tratamento WDG 0% e de 4% (1/25) (IC 95% 0-0,12) no tratamento WDG 30%. A carcaça dos animais dos tratamentos WDG 15 e 45% foram negativas para o gene *stx1*. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a ocorrência de STEC nas fezes e superfície das carcaças de bovinos alimentados com diferentes níveis de concentração de WDG. Todas as amostras, tanto de carcaça quanto de fezes, foram negativas para *Salmonella* spp.

TABELA 7. Ocorrência global e *odds ratio* de STEC (*stx1* e/ou *stx2*) na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Parâmetros	Coefficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	IC 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	IC 95% ⁵
STEC (<i>stx1</i> e/ou <i>stx2</i>)							
Intercepto	-1,3591	0,7561					
Tratamentos ⁶			0,3083				
WDG 0%	Referência			Referência		20,44 ^a	(6,77-50,30)
WDG 15%	-0,56	0,81		0,57	(0,12-2,86)	12,83 ^a	(3,18-40,05)
WDG 30%	-1,19	0,91		0,30	(0,05-1,84)	7,25 ^a	(1,64-31,99)
WDG 45%	-1,90	1,15		0,15	(0,02-1,47)	3,71 ^a	(0,47-27,12)

¹ Erro padrão

² *Odds ratio* derivado do modelo linear generalizado (regressão logística).

³ Intervalo de confiança de 95% do *Odds ratio*.

⁴ Ocorrência ajustada derivada do modelo linear generalizado (regressão logística).

⁵ Intervalo de confiança de 95% das ocorrências ajustadas.

⁶ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

TABELA 8. Ocorrência ajustada e *odds ratio* de STEC (*stx2*) e EPEC (*eae*) na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Parâmetros	Coefficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	IC 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	IC 95% ⁵
STEC (<i>stx2</i>)							
Intercepto	-1,99	0,85					
Tratamentos ⁶			0,4867				
WDG 0%	Referência			Referência		12,07 ^a	(2,92-42,41)
WDG 15%	0,07	0,88		1,08	(0,19-6,23)	12,85 ^a	(2,87-43,09)
WDG 30%	-1,30	1,20		0,27	(0,03-2,96)	3,59 ^a	(0,45-28,58)
WDG 45%	-1,27	1,20		0,28	(0,03-3,05)	3,71 ^a	(0,44-28,73)
EPEC (<i>eae</i>)							
Intercepto	-2,42	0,89					
Tratamentos ⁵			0,4228				
WDG 0%	Referência			Referência		8,17 ^a	(0,65-56,09)
WDG 15%	1,13	1,02		3,11	(0,37-26,19)	21,68 ^a	(2,58-74,94)
WDG 30%	0,67	1,05		1,95	(0,22-17,14)	14,78 ^a	(1,75-69,26)
WDG 45%	-0,79	1,35		0,45	(0,03-6,73)	3,87 ^a	(0,24-42,24)

¹ Erro padrão

² *Odds ratio* derivado do modelo linear generalizado (regressão logística).

³ Intervalo de confiança de 95% do *Odds ratio*.

⁴ Ocorrência ajustada derivada do modelo linear generalizado (regressão logística).

⁵ Intervalo de confiança de 95% das ocorrências ajustadas.

⁶ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

TABELA 9. Ocorrência ajustada e *odds ratio* de STEC (*stx1* e/ou *stx2*) e EPEC (*eae*) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Parâmetros	Coefficiente	EP	Valor <i>P</i>	OR ¹	IC 95% ²	Ocorrência Ajustada (%) ³	IC 95% ⁴
Gene <i>stx1</i>							
Intercepto	1,40	0,67					
Tratamentos ⁵			0,2102				
WDG 0%	Referência			Referência		80,29 ^a	(37,93-95,21)
WDG 15%	1,88	1,16		6,56	(0,66-65,61)	96,39 ^a	(66,72-99,61)
WDG 30%	1,94	1,15		6,93	(0,70-68,64)	96,58 ^a	(68,12-99,63)
WDG 45%	0,72	0,82		2,06	(0,41-10,41)	89,35 ^a	(52,62-97,79)
Gene <i>stx2</i>							
Intercepto	0,26	0,97					
Tratamentos ⁵			0,5294				
WDG 0%	Referência			Referência		56,54 ^a	(19,36-84,71)
WDG 15%	1,98	1,36		7,22	(0,38-136,01)	90,37 ^a	(33,81-98,27)
WDG 30%	1,36	1,30		3,88	(0,23-66,96)	83,47 ^a	(30,08-93,35)
WDG 45%	1,01	1,26		2,74	(0,17-44,64)	78,07 ^a	(27,95-92,44)
Gene <i>eae</i>							
Intercepto	0,37	0,52					
Tratamentos ⁵			0,2225				
WDG 0%	Referência			Referência		59,12 ^a	(28,35-83,15)
WDG 15%	1,25	0,70		3,49	(0,86-14,09)	83,44 ^a	(52,74-95,22)
WDG 30%	0,43	0,61		1,53	(0,46-5,15)	68,92 ^a	(37,06-88,34)
WDG 45%	1,08	0,66		2,95	(0,79-10,97)	81,00 ^a	(50,45-94)

¹ *Odds ratio* derivado do modelo linear generalizado (regressão logística).

² Intervalo de confiança de 95% do *Odds ratio*.

³ Ocorrência ajustada derivada do modelo linear generalizado (regressão logística).

⁴ Intervalo de confiança de 95% das ocorrências ajustadas.

⁵ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

Letras sobrescritas iguais indicam que não houve diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

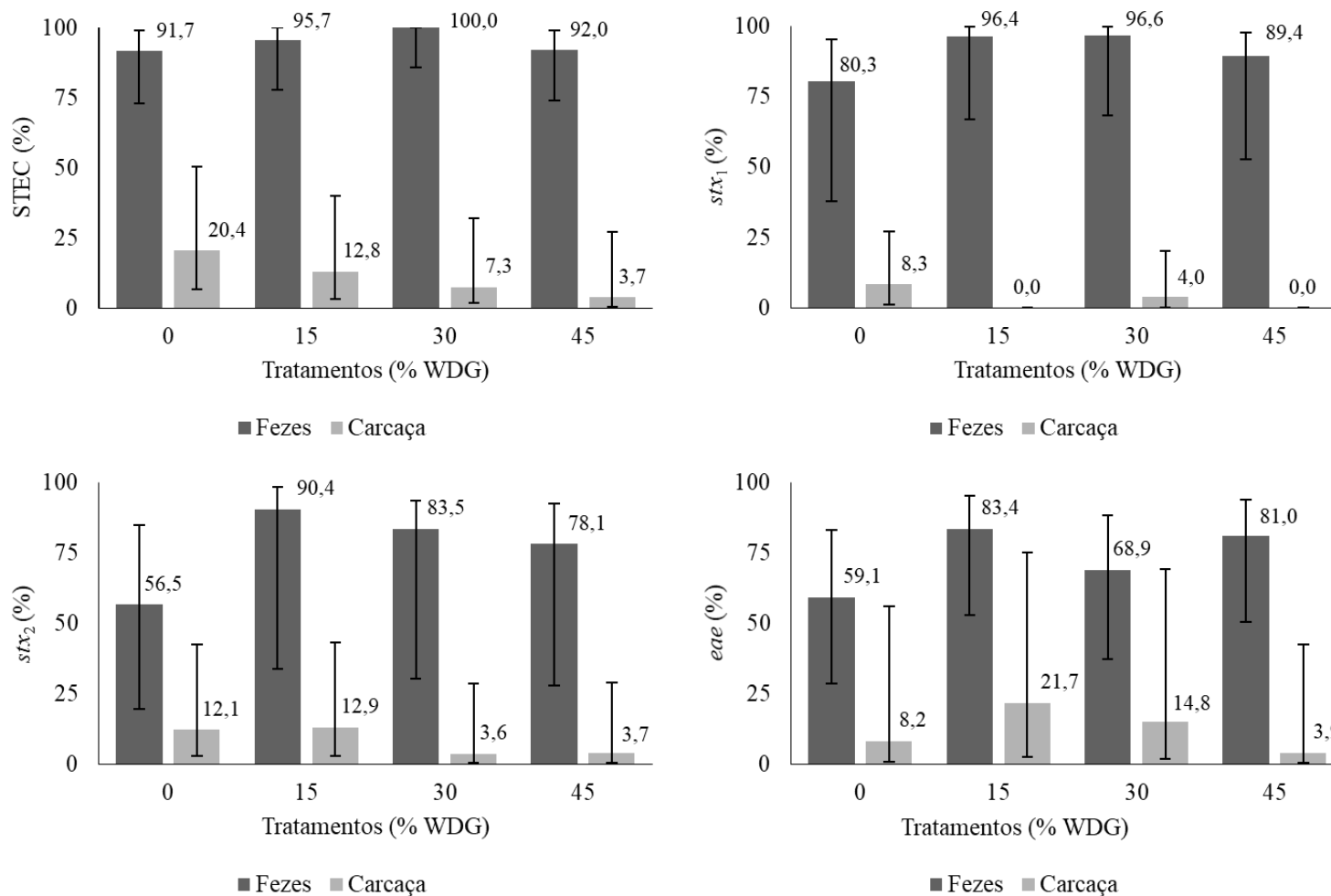


FIGURA 6. Ocorrência e IC 95% de STEC (*stx1* e/ou *stx2*) e EPEC (*eae*) nas fezes e superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG). Figura elaborada a partir das Tabelas 7, 8 e 9.

5.2 Análises físico-químicas das fezes

Para análises físico-químicas, 100 animais foram incluídos no estudo. Desses, 22 animais eram do tratamento WDG 0%, 23 do WDG 15%, 25 do WDG 30% e 24 do WDG 40%. Seis não foram considerados no modelo estatístico, sendo três por problemas de saúde, sendo um do tratamento WDG 0% e dois do WDG 15%. Devido à ausência de conteúdo fecal no piso da baia, não foi possível colher as fezes de outros três animais, um pertencendo ao tratamento WDG 40% e dois ao WDG 0%.

Os resultados da média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis físico-químicas avaliadas nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis WDG estão demonstrados na Tabela 10, 11 e 12. Os tratamentos com 30 e 45% de WDG resultaram em níveis significativamente mais altos de FDN quando comparados com os tratamentos WDG 0 e 15% ($P < 0,05$). Quanto a PB, também foram observadas diferenças entre os tratamentos WDG 15 e 30% ($P = 0,0116$) (Tabela 10).

TABELA 10. Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis físico-químicas avaliadas nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

	Tratamentos (% WDG) ¹				EPM ²	Valor <i>P</i>
	0	15	30	45		
Matéria seca (%)	0,19	0,19	0,19	0,18	0,01	0,7218
FDN ³ (% MS)	45,87 ^a	46,44 ^a	52,57 ^{b*}	54,27 ^{b*}	1,29	0,0006
FDA ⁴ (% MS)	42,23	38,10	41,04	39,83	1,25	0,1536
Proteína bruta (% MS)	13,33 ^{ab}	12,99 ^a	14,06 ^{b*}	13,56 ^{ab}	0,22	0,0116
Extrato etéreo (% MS)	1,87	1,83	2,14	1,91	0,10	0,1159
pH	6,30	6,26	6,16	6,23	0,06	0,2114
Ácido lático						
mg/g MN ⁵	0,11	0,11	0,09	0,10	0,01	0,7506
mg/g MS ⁶	0,60	0,57	0,49	0,59	0,07	0,6982

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Erro padrão médio.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro.

⁴ Fibra insolúvel em detergente ácido.

⁵ Concentração em mg/g da matéria natural.

⁶ Concentração em mg/g da matéria seca.

a, b, c, d Valores com letras distintas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.

Quanto à média dos quadrados mínimos da concentração de AGV, as fezes dos animais do tratamento WDG 15% apresentaram concentração média de ácido propiônico (C₃) maior que as do tratamento WDG 45% ($P = 0,0283$). A concentração média de ácido butírico (C₄) foi maior nas fezes dos animais do tratamento WDG 15% quando comparada

com as dos tratamentos WDG 30 e 45% ($P = 0,0048$). O tratamento WDG 0% apresentou maior concentração de C₄ do que o tratamento WDG 45% ($P = 0,0048$) (Tabela 11).

TABELA 11. Média dos quadrados mínimos e IC 95% da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

	Tratamentos (% WDG) ¹				Valor P
	0	15	30	45	
AGV (mg/g MN)²					
Acético (C ₂)					0,2354
Média	33,00	36,87	26,04	23,61	
IC 95%	(22,88-44,92)	(26,19-49,31)	(17,31-36,47)	(15,29-33,65)	
Propiônico (C ₃)					0,0283
Média	15,47 ^{ab}	16,66 ^a	10,87 ^{ab}	9,11 ^b	
IC 95%	(11,61-19,84)	(12,70-21,14)	(7,75-14,46)	(6,23-12,47)	
Butírico (C ₄)					0,0048
Média	8,43 ^{ab}	10,08 ^a	5,77 ^{bc}	4,70 ^{c*}	
IC 95%	(6,27-10,86)	(7,75-12,68)	(4,03-7,77)	(3,09-6,57)	
Isobutírico					0,8895
Média	0,59	0,60	0,53	0,53	
IC 95%	(0,42-0,76)	(0,44-0,77)	(0,38-0,70)	(0,37-0,69)	
Valérico (C ₅)					0,1231
Média	0,62	0,62	0,76	0,86	
IC 95%	(0,47-0,79)	(0,47-0,78)	(0,61-0,93)	(0,70-1,02)	
Isovalérico					0,6011
Média	0,46	0,61	0,53	0,51	
IC 95%	(0,31-0,62)	(0,45-0,77)	(0,39-0,68)	(0,36-0,66)	
AGV Total					0,0958
Média	58,70	65,73	45,12	39,63	
IC 95%	(42,72-77,16)	(48,87-85,03)	(31,59-61,00)	(26,87-54,80)	
Razão AGV (MN)³					
C ₂ /C ₃					0,0574
Média	2,18	2,28	2,23	2,75 [*]	
IC 95%	(1,87-2,51)	(1,97-2,61)	(1,92-2,55)	(2,41-3,10)	
C ₂ +C ₄ /C ₃					0,0876
Média	2,75	2,89	2,76	3,30	
IC 95%	(2,40-3,11)	(2,54-3,26)	(2,42-3,12)	(2,94-3,69)	

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Concentração média de ácidos graxos voláteis (AGV) em mg/g da matéria natural.

³ Razão entre os ácidos orgânicos voláteis (AGV) na matéria natural.

^{a, b, c, d} Valores com letras disínticas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.

Em relação à média dos quadrados mínimos da proporção de amido, as fezes dos animais dos tratamentos WDG 0 e 15% resultaram em proporções mais altas quando comparadas com as dos tratamentos WDG 30% e 45% ($P = 0,0002$). As fezes dos animais do tratamento WDG 15% apresentaram proporção média de C₄ significativamente maior quando comparado com as fezes dos animais do tratamento WDG 45% ($P = 0,0077$). A proporção de C₅ nas fezes dos animais do tratamento WDG 45% foi significativamente

maior do que nas fezes dos animais dos tratamentos 0 e 15% de WDG ($P = 0,004$) (Tabela 12). No Anexo 2 estão apresentados os resultados da média dos quadrados mínimos e IC 95% de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes em mg/g da matéria seca.

TABELA 12. Média dos quadrados mínimos e IC 95% da proporção de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

	Tratamentos (% WDG) ¹				Valor <i>P</i>
	0	15	30	45	
Amido (% MS)					0,0002
Média	8,83 ^a	11,47 ^a	5,30 ^{b*}	4,82 ^{b*}	
IC 95%	(6,87-11,27)	(0,34-114,88)	(4,10-6,79)	(3,70-6,21)	
Proporção de AGV² (%)					
Acético (C ₂)					0,1722
Média	55,35	56,1	56,06	60,42	
IC95%	(51,85-59,09)	(52,57-59,85)	(52,59-59,75)	(56,62-64,47)	
Propiônico (C ₃)					0,0612
Média	26,01	24,94	25,03	21,95 [*]	
IC95%	(23,78-28,45)	(22,81-27,25)	(22,93-27,32)	(20,08-23,99)	
Butírico (C ₄)					0,0077
Média	14,07 ^{ab}	14,89 ^a	12,44 ^{ab}	11,82 ^b	
IC95%	(12,66-15,62)	(13,44-16,48)	(11,26-13,73)	(10,67-13,08)	
IsoC ₄					0,3224
Média	0,95	0,98	0,88	1,29	
IC95%	(0,66-1,29)	(0,69-1,31)	(0,61-1,20)	(0,96-1,68)	
Valérico (C ₅)					0,0046
Média	1,09 ^a	0,95 ^a	1,57 ^{ab}	1,97 ^{b*}	
IC95%	(0,78-1,46)	(0,66-1,29)	(1,19-2,03)	(1,53-2,49)	
IsoC ₅					0,0883
Média	0,77	0,99	1,01	1,30 [*]	
IC95%	(0,53-1,04)	(0,73-1,29)	(0,75-1,31)	(1,01-1,64)	
AGV ³ Total	98	99	97	99	

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Proporção de ácidos graxos voláteis (AGV)

³ Proporção de ácidos graxos voláteis totais (AGV)

a, b, c, d Valores com letras disitintas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.

No Anexo 2 está apresentada a média dos quadrados mínimos e IC 95% de ácidos graxos voláteis (AGV) com base da na matéria seca das fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG).

6 DISCUSSÃO

6.1 Limitações do estudo

O presente estudo corresponde a uma extensão do projeto de pesquisa intitulado “Níveis de grãos de destilaria em dietas para bovinos de corte confinados: desempenho, características de carcaça e qualidade de carne” sob-responsabilidade do Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto - FMVZ/UNESP, Botucatu, SP. Portanto, por não ter sido delineado com o objetivo de responder a questões microbianas, a principal limitação deste estudo foi o tamanho amostral, conforme cálculo apresentado na Tabela 4, que foi considerado insuficiente.

Do ponto de vista epidemiológico, esse estudo foi um ensaio clínico randomizado experimental analítico, ou seja, foi desenhado com o objetivo de investigar os efeitos de uma intervenção em particular (dietas com WDG), na qual os animais selecionados foram aleatoriamente alocados para os grupos de tratamento (dietas com WDG) e controle (sem WDG) e os resultados foram avaliados comparando-se os desfechos (excreção de patógenos) e contaminação das carcaças entre esses grupos. Entretanto, embora nesse tipo de estudo o ideal seja a realização de amostragem longitudinal, ou seja, em vários momentos ao longo do tempo (ROTHMAN et al., 1998), no presente estudo a colheita de amostras de fezes foi realizada somente em um único momento o que, diante da característica intermitente na excreção desses patógenos (GOPINATH et al., 2012; MUNNS et al., 2015), pode ter limitado a identificação de animais positivos e, conseqüentemente, a verificação de associação entre os tratamento e os desfechos.

Devido as flutuações de pH e composição química nos diversos compartimentos do TGI bovino, acredita-se que seria interessante a avaliação do comportamento desses patógenos em todos os compartimentos do TGI, entretanto, para esse tipo de avaliação seria necessário um número elevado de animais fistulados, o que não é viável devido a complexidade logística e aspectos éticos associados, sobretudo, ao bem estar animal.

6.2 Hipóteses do estudo

A principal hipótese desse estudo era que, quanto maior o nível de inclusão de WDG na dieta, maior seria a ocorrência de patógenos nas fezes e, conseqüentemente, na carcaça. No entanto, não houve diferença na ocorrência desses patógenos nas fezes e na carcaça de bovinos submetidos a dietas contendo 0, 15, 30 e 45% de WDG (Tabelas 7, 8 e 9 e Figura 6). Esses resultados não concordam com a maioria dos estudos, os quais demonstraram que a inclusão de DG na dieta contribui para o aumento da ocorrência de

enterobactérias patogênicas nas fezes de bovinos (JACOB et al., 2008; WELLS et al., 2009; WELLS et al., 2011; BERRY et al., 2017; CHANEY et al., 2018; FINK et al., 2018. SCHNEIDER et al., 2018).

Porém, não há um consenso científico sobre a partir de que nível de inclusão o DG pode influenciar no aumento da prevalência de patógenos nas fezes de bovinos. Jacob et al. (2010), ao avaliarem 3350 amostras de fezes, verificaram que não houve diferença na ocorrência de *E. coli* O157:H7 entre os grupos controle (sem adição de DG) e grupo recebendo 20% de DG ($P = 0,4$), todavia, bovinos que receberam dietas com 40% do coproduto apresentaram maior ocorrência do que os animais dos grupos controle e dos que receberam 20% de DG ($P = 0,02$ e $P = 0,05$, respectivamente).

Outros estudos reportaram que inclusões de DG a partir de 13,9 (WELLS et al., 2009), 15 (CHANEY et al., 2018) e 25% (PADDOCK et al. 2013) favorecem o aumento da ocorrência de *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos. Recentemente, Chaney et al. (2018) verificaram que a prevalência de *E. coli* O157:H7 foi maior nas fezes de bovinos que consumiram 15% de DG do que nas fezes dos animais que receberam 8%, com prevalência média de 23,9 e 9,4%, respectivamente ($P < 0,01$). Resultados semelhante foram encontrados por Wells et al. (2009), os quais demonstraram que a ocorrência *E. coli* O157:H7 nas fezes de bovinos que receberam 13,9% de WDGS foi aproximadamente o dobro quando comparada com a ocorrência média nas fezes do grupo sem WDG, sendo de 17,8 e $8,8 \pm 2,05\%$, respectivamente ($P = 0,009$). O mesmo ocorreu nas fezes dos animais submetidos à dieta contendo 40% de WDGS, os quais apresentaram ocorrência média de $14,9\% \pm 1,85$, enquanto que no grupo controle foi de $1,5\% \pm 1,8$ ($P = 0,0001$).

Os mecanismos envolvidos na associação entre DG e a ocorrência de patógenos nas fezes de bovinos ainda não foram totalmente elucidados. Os estudos supracitados sugerem que mudanças no ambiente pós-rúmen, sobretudo no intestino grosso e junção reto anal, em consequência do aumento na concentração de proteínas e diminuição na concentração de amido no coproduto, resultam em menor taxa fermentativa, aumento do pH e diminuição nas concentrações de AGV, o que cria ambiente favorável para a colonização e multiplicação de enterobactérias patogênicas nesses locais (WELLS et al., 2009; JACOB et al., 2010; PADDOCK et al., 2013; CHANEY et al., 2018).

Essas suposições foram confirmadas por Wells et al. (2009), os quais demonstraram que o pH das fezes dos animais submetidos a dieta contendo 40% de WDGS foi significativamente maior do que o pH do grupo controle, sem adição do coproduto, média de 5,85 e 6,47, respectivamente ($P = 0,0001$). Tanto a concentração de AGV quanto a de

lactato foram menores nas fezes dos animais submetidos à dieta com 40% de WDGS quando comparadas com o grupo controle ($P = 0,0008$ e $P = 0,0001$, respectivamente).

Entretanto, Paddock et al. (2013) verificaram que o pH do conteúdo do colón foi menor em bovinos que receberam dietas com 25% de DDG, média de 6,8, do que aqueles que não receberam o coproduto na dieta, média de 6,34 ($P = 0,0001$). Os autores também verificaram que a adição de amido na dieta com DDG não reduziu a ocorrência e concentrações de *E. coli* O157:H7 nas fezes. Porém, a ocorrência foi maior nas fezes dos animais dos grupos 25% de DDG e 25% de DDG + amido do que nas fezes dos animais do grupo controle, sem adição de DDG ($P < 0,05$). Tendo em vista que o amido puro é fermentado quase que completamente no rúmen, sobrando pouca quantidade para os intestinos, os autores supõem que a inclusão de amido puro pode não ter o mesmo efeito na fermentação no intestino grosso do que o amido do grão de milho e que outros componentes do DG podem servir de substrato para o crescimento desse patógeno.

Os principais limitantes da colonização e multiplicação de STEC e *Salmonella* spp. no TGI de bovinos são o baixo pH, alta concentração de AGV e de outros compostos inibitórios produzidos pelos micro-organismos ruminais e a competição de nutrientes por bactérias comensais. Mesmo diante dessas situações, a STEC é capaz de sobreviver no ambiente ruminal (PADDOCK et al., 2013; SEGURA et al., 2018).

Segura et al. (2018), ao avaliarem fatores de risco associados a persistência de STEC O157:H7 inoculada em cinco compartimentos do TGI (rúmen, intestino delgado, ceco, cólon e reto), verificaram que essa enterobactéria foi capaz de sobreviver no rúmen e que ocorreu um aumento de 5 log UFC/mL no intestino delgado após 4 horas de incubação, permanecendo em alta concentração por até 24 horas, sendo que no intestino delgado o crescimento foi significativamente maior do que nos outros locais do TGI ($P < 0,001$). No ceco, cólon e reto a população de STEC O157:H7 aumentou após um período de 4 a 8 horas de incubação e permaneceu estável por até 24 horas ($\approx 10^5$ UFC/mL). Os autores também verificaram que o pH foi menor e que a concentração de AGV foi maior no rúmen do que nos outros locais ($P < 0,05$). Os autores sugerem que as regiões pós-rúmen, sobretudo, em nível de intestino, proporcionam melhores condições de pH e menor concentração de AGV para o crescimento e colonização de enterobactérias, diferente do rúmen, onde a STEC O157:H7 foi capaz de sobreviver, mas não de se multiplicar.

No presente estudo, os bovinos do tratamento WDG 0% foram alimentados com dieta padrão dos confinamentos brasileiros (MILLEN et al., 2009; OLIVEIRA; MILLEN, 2014; PINTO; MILLEN, 2016), o que resultou em alta ingestão de amido e

consequentemente maior excreção nas fezes. Não foi observada diferença na excreção de amido entre os tratamentos 0 e 15% de WDG (Tabela 12). Diferente dos resultados reportados por Paddock et al. (2013), os quais verificaram que não houve diferença na concentração de amido nas fezes de bovinos recebendo dietas sem DDG e com 25% de DDG ($P = 0,33$).

A concentração de ácido propiônico no presente estudo foi maior nas fezes dos animais do tratamento 15% de WDG dos que nas fezes dos animais do tratamento com 45% de WDG ($P = 0,02$). A maior inclusão de amido, que é um carboidrato não fibroso altamente fermentável, estimula a rota metabólica do ácido propiônico via lactato e desfavorece a rota do succinato, o que resulta em maior produção de ácido lático e expressiva redução do pH. Essas vias metabólicas alteram a microbiota e, consequentemente, a proporção e quantidade dos AGV produzidos, por exemplo, maior relação propionato:acetato e maior produção de ácido valérico, que pode ser um sinalizador da utilização do ácido lático (OWENS; BASALAN, 2016).

O WDG apresenta maior concentração de proteína e FDN, em relação ao milho moído (NRC, 2016). Portanto, como esperado, a concentração de FDN foi significativamente maior nas fezes dos animais dos tratamentos contendo 30 e 45% de WDG do que nas fezes dos animais do tratamento com 0 e 15% de WDG ($P = 0,0006$), que não diferiram entre si ($P = 0,05$). A concentração de PB foi significativamente maior nas fezes dos bovinos do tratamento com 30% de WDG do que no tratamento com 15% de WDG ($P = 0,01$). Embora, fosse esperada maior concentração de PB no tratamento com 45% de WDG, esse não diferiu dos outros tratamentos (Tabela 10).

A hipótese de que a baixa concentração de amido no DG gera menor fermentação pós-rúmen, aumento do pH e redução na concentração de AGV e, consequentemente maior ocorrência de patógenos (WELLS et al., 2009; JACOB et al., 2010; PADDOCK et al., 2013; CHANEY et al., 2018), não se aplica aos achados do presente estudo, que embora não tenha encontrado diferença descritiva na ocorrência de STEC nas fezes, observou-se que quanto maior o nível de WDG, menor a ocorrência nas carcaças, sendo que as ocorrência nas carcaças dos tratamentos 0, 15, 30 e 45% de WDG foi de 20,4, 12,8, 7,3 e 3,7%, respectivamente (Tabela 7 e Figura 6). Ou seja, os resultados do presente estudo são completamente contrários aos reportados até o momento (WELLS et al., 2009; JACOB et al., 2010; PADDOCK et al., 2013; CHANEY et al., 2018).

As principais suposições para os resultados encontrados nesse estudo são: 1) Uma vez que todas as dietas são caracterizadas por apresentarem alta energia, todos os

tratamentos proporcionaram alta taxa fermentativa, porém em locais diferentes, portanto a ocorrência elevada de STEC nas fezes pode ser resultado da seleção de cepas ácido-resistentes; 2) A utilização de inoculante bacteriano na silagem de WDG e a possível presença de contaminantes no coproduto, tais como resíduos de antibióticos e micotoxinas, podem ter inibido o crescimento de STEC após ingestão pelos animais, o que explicaria a menor ocorrência do patógeno na carcaça dos bovinos submetidos a dietas com inclusão do coproduto.

De forma geral, as dietas do presente estudo são caracterizadas por apresentarem alta energia, ou seja, elevada concentração de carboidratos, sejam eles fibrosos em maior concentração nos tratamentos com inclusão de WDG, ou não fibrosos como o amido proveniente do milho moído, no tratamento 0% de WDG. A digestão de carboidratos, sobretudo celulose e hemicelulose é mais difícil no intestino grosso, entretanto pode ocorrer. Além disso, também pode ocorrer fermentação do amido residual nesse local, principalmente quando a dieta é rica em grão de milho. Assim como no rúmen, parte desses carboidratos pode ser fermentada pós-rúmen, originando AGV (OWENS; BASALAN, 2016; HALL; MERTENS, 2017).

Acredita-se que devido a maior quantidade de milho na dieta nos tratamentos 0 e 15 de WDG e, conseqüentemente, maior concentração de amido e proteína digerível no rúmen (PDR), os animais desses tratamentos deveriam apresentar alta taxa fermentativa no rúmen, o que favoreceria a sincronização ruminal e maior produção de AGV nesse local e que ainda, devido à alta produção de AGV no rúmen, uma quantidade passaria para ser absorvida pós-rúmen, assim como parte do amido e da PDR também poderia ter passado para ser fermentada pós-rúmen.

Entretanto, os resultados descritivos mostraram que os animais do tratamento WDG 15% apresentaram maior ocorrência de coliformes totais e *E. coli* não patogênica na superfície das carcaças (Tabela 5), bem como maior ocorrência de STEC (*stx2*) e EPEC (*eae*) na superfície das carcaças e fezes (Figura 6) em relação aos animais dos outros tratamentos. Sugere-se que devido ao fato desses animais terem recebido baixa concentração de WDG, portanto menos FDN e PNDR, associado à baixa qualidade do milho fornecido, o que o torna mais duro e conseqüentemente reduz à biodisponibilidade de amido, os animais desse grupo de tratamento podem ter apresentado menor taxa fermentativa e menor sincronização ruminal, o que contribuiu para maior ocorrência de patógenos.

Na produção de etanol de milho, o amido é fermentado em etanol, restando fibra,

proteína e gordura. O teor de proteína é concentrado, passando de 10% no milho para 30% no coproduto (AHERN et al., 2016). A porção proteica consiste basicamente de zeína, proteína derivada do endosperma do grão de milho (LIU, 2012). O grão de milho produzido no Brasil possui mais zeína do que o grão dos EUA. Essa proteína está associada com a “vitrosidade” e com a textura do grão. Portanto, os grãos brasileiros são mais “vítreos” e duros do que os grãos americanos, o que confere menor degradação proteica no rúmen (DICOSTANZO; WRIGH, 2012; LINO, 2014; LEE et al., 2016). Portanto, supõe que os tratamentos com 30 e 45% de WDG proporcionaram maior ingestão de proteína não degradável no rúmen (PNDR) e FDN, o que resultou em maior fermentação pós-rúmen.

Outra diferença entre o DG desse estudo e de outros estudos refere-se ao teor de lipídios no DG, que pode ser variável e está associado à coprodução de óleo de milho pelas usinas (LEHMKUHLER; BURRIS, 2011). Entretanto, nos EUA predomina a produção de DG desengordurado com 7 a 8% de extrato etéreo, enquanto que no Brasil as fábricas têm disponibilizado DG desengordurado com 4 a 5% de extrato etéreo.

De acordo com esses pressupostos e resultados microbianos e físico-químicos obtidos nesse estudo, sugere que todos os tratamentos apresentaram taxa fermentativa semelhante, entretanto em maior ou menor intensidade em locais diferentes, no rúmen ou pós-rúmen.

O pH médio das fezes dos bovinos de todos os tratamentos do presente estudo foi de 6,23 e a concentração média de AGV totais foi de 52,3 mg/g MN (Tabela 10 e 11). Essas condições deveriam criar um ambiente hostil para o crescimento de enterobactérias (KANJEE; HOURY, 2013; SEGURA et al., 2018). Segura et al. (2018) verificaram que uma cepa de *E. coli* O157:H7 experimentalmente inoculada no rúmen foi capaz de sobreviver a um pH ruminal médio de 6.22 ± 0.17 , entretanto esse ambiente não criou condições favoráveis para o crescimento do patógeno, o qual reduziu 1 log UFC/mL após 4 horas de incubação e se manteve em baixa concentração ($\approx 10^3$ UFC/mL) por até 24 horas.

Esse cenário, sobretudo em relação ao pH do ambiente ruminal demonstrado por Segura et al. (2018), é semelhante ao encontrado nas fezes dos animais desse estudo, o que deveria ter resultado em redução no crescimento de enterobactérias. No entanto, nesse estudo foi observada alta ocorrência de STEC nas fezes em todos os tratamentos, sendo de 91,7, 95,7, 100 e 92% nos tratamentos 0, 15, 30 e 45% de WDG (Figura 6). Portanto, uma possibilidade é que as dietas tenham proporcionado à seleção de cepas ácido-resistentes, ou seja, que foram capazes de sobreviver as flutuações de pH ao longo do TGI (KANJEE;

HOURY, 2013; BEIER et al., 2013; LAJHAR et al., 2017).

Normalmente, as enterobactérias crescem melhor em condições de pH neutro. Durante a passagem pelo TGI, essas precisam sobreviver ao estômago extremamente ácido, onde o pH varia de 1,5 a 3,0 e atua como importante barreira contra infecções (KANJEE; HOURY, 2013). Após passar pelo estômago, essas enterobactérias passam para os intestinos delgado e grosso, os quais de forma geral apresentam pH neutro ou básico (KANJEE; HOURY, 2013). Porém, em bovinos, dependendo da dieta, podem ocorrer altos níveis de fermentação pós-rúmen e, conseqüentemente, a produção de AGV e outros compostos, de modo que essas enterobactérias irão passar novamente por estresse ácido nesses locais (WHEELER; NOLLER, 1977; PARISH, 2017).

Lajhar et al. (2017), ao avaliarem a resistência a ácidos graxos de 88 isolados de *E. coli* O26, sendo 10 colhidos de casos clínicos de humanos e 78 de bovinos entre 1995 e 2013 na Austrália, demonstraram que independente da fonte e patotipo, 87% dos isolados apresentaram elevada concentração inibitória mínima (CIM) ($\geq 1024 \mu\text{g/ml}$) para os ácidos testados (acético, cítrico, láctico e propiônico) e que as CIM para os isolados de *E. coli* O26 ocorreram em baixo pH, entre 3,31 e 4,55. Resultados semelhantes foram reportados por Beier et al. (2013) nos EUA, ao avaliarem a resistência de cepas de *E. coli* O157:H7 isoladas de carcaça, fezes e peles de bovinos a desinfetantes ácidos, os autores verificaram que o CIM para 99% das cepas ocorreu em pH entre 3,7 e 4,29.

As bactérias usam mecanismos fisiológicos passivos e ativos para sobreviver ao estresse ácido. O sistema passivo promove o tamponamento de aminoácidos, proteínas, poliaminas, polifosfatos e fosfato inorgânico presentes no citoplasma. Os sistemas ativos dividem-se em sistemas fisiológicos, metabólicos e consumidores de prótons (KANJEE; HOURY, 2013). Portanto, mais estudos são necessários para compreender qual o papel da dieta no desenvolvimento de cepas ácido resistentes, o que permitirá a utilização do manejo dietético como ferramenta para mitigar a seleção desses patógenos em bovinos.

Outro aspecto, refere-se à forma como o coproduto foi fornecido para os bovinos do presente estudo, sendo diferente da maioria dos estudos anteriores, os quais normalmente utilizaram o coproduto seco (DDG) (JACOB et al., 2008; FINK et al., 2008; CHANEY et al., 2018; SCHNEIDER et al., 2008) e sem passar por processos de conservação como a ensilagem. O WDG apresenta umidade elevada, cerca de 30% da MS, sendo altamente susceptível a deterioração, portanto no Brasil, devido ao clima tropical e úmido, uma alternativa consiste na ensilagem do WDG. No presente estudo a silagem de WDG foi inoculada com aditivo biológico FeedtechTM Silage F600 (DeLaval), com a finalidade de

reduzir a deterioração anaeróbica (silo vedado) e aeróbica (silo aberto), preservando o valor nutritivo da silagem. Esse aditivo possui em sua composição $1,0 \times 10^{11}$ UFC/g de *Lactobacillus buchneri* (DSM 13573) e de *Lactobacillus plantarum* (DSM 3676 e DSM 3677), que resultam em no mínimo $2,0 \times 10^5$ UFC/g de material ensilado, conforme informações do fabricante.

O uso de inoculantes bacterianos tem apresentado efeitos positivos, que incluem a otimização da etapa de fermentação do processo de ensilagem, aumento da concentração de MS e nutrientes e estabilidade aeróbica da silagem (QUEIROZ et al., 2018). Normalmente, esses inoculantes possuem em sua composição, espécies homofermentativas, como o *L. plantarum*, usada pela sua capacidade de fermentar carboidratos solúveis em água, alta produção de ácido lático e rápida redução de pH. Outra espécie é a *L. buchneri*, um lactobacilo heterofermentativo que produz altas concentrações de ácido acético na silagem, o que inibe fungos, melhorando assim a estabilidade aeróbica da silagem (HENDERSON, 1993; BOLSEN et al., 1996; GOLLOP et al., 2004).

Inúmeros estudos têm demonstrado efeito positivo no desempenho produtivo de animais alimentados com silagem inoculada (WEINBERG; MUCK, 1996; KUNG; MUCK, 1997; RABELO et al., 2016; RABELO et al., 2018; BEN-MEIR et al., 2018). Uma das principais explicações para esses resultados é que as bactérias lácticas presentes nos inoculantes atuam como probióticos, interagindo com os micro-organismos do rúmen, o que melhora a função ruminal e conseqüentemente o desempenho produtivo (WEINBERG et al., 2004; HAN et al., 2014; MALDONADO et al., 2018).

Além desses efeitos, alguns probióticos demonstraram ação antimicrobiana, como a produção de bacteriocinas e ácidos graxos com potencial de inibir o crescimento de patógenos na silagem e, assim, impedir a disseminação de patógenos no rebanho (GOLLOP et al., 2004; OGUNADE et al., 2016; OGUNADE et al., 2017; SRISHESHARAM et al., 2018).

Recentemente, Srisesharam et al. (2018), ao avaliarem a atividade antibacteriana da *L. plantarum* em silagem de azevém (*Lolium multiflorum*), demonstraram que o inoculante foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na silagem. Entretanto, Gollop et al. (2004) demonstraram que a ação antimicrobiana de inoculantes depende das condições de pH e atividade de água da silagem. Esses autores verificaram que o inoculante *L. buchneri* apresentou atividade antimicrobiana na silagem de milho úmido, mas não em outros tipos de silagem, trigo e milho seco.

Weinber et al. (2016) em estudo *in vitro* verificaram que bactérias lácticas usadas como inoculantes de silagem não foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* em líquido ruminal. Porém, a *E. coli* foi suprimida quando o pH do líquido ruminal atingiu valores abaixo de 5. Os autores salientam que o rúmen é apenas uma parte do TGI dos ruminantes, e que são necessárias pesquisas que avaliem o efeito dos inoculantes em nível de intestino e em condições naturais.

Assim, devido à forma diferenciada do uso de DG nos confinamentos do Brasil, os autores do presente estudo sugerem que bovinos alimentados com silagem de WDG com inoculantes bacterianos podem apresentar menor ocorrência de patógenos nas fezes e carcaça. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para validar o efeito antimicrobiano e probiótico desses inoculantes em grãos de destilaria e se esses efeitos interferem na excreção de patógenos nas fezes e, conseqüentemente, na contaminação da carcaça.

Outra hipótese para os resultados encontrados nesse estudo, com base principalmente nos resultados de ocorrência de STEC observados na carcaça (Tabela 7 e Figura 6), é que a presença de resíduos de antibióticos e outros contaminantes no WDG possa ter contribuído para menor ocorrência nas carcaças dos animais submetidos aos tratamentos com maior concentração do coproduto (LEE et al., 2016).

Um dos desafios na produção de etanol de milho é controlar a contaminação bacteriana durante a etapa de fermentação. Bactérias produtoras de ácido láctico, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella*, são os contaminantes mais comuns. Essas bactérias competem com o *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que degrada o amido, por nutrientes essenciais para o seu crescimento. Além disso, são responsáveis por produzirem ácidos graxos, como o láctico e acético, que inibem o crescimento de leveduras. Essas bactérias resistem a altas temperaturas, baixo pH e altas concentrações de etanol e são capazes de crescer rapidamente, atingindo números elevados de células viáveis antes da conclusão da fermentação da levedura. Esse tipo de contaminação bacteriana leva a redução do rendimento e da qualidade do etanol produzido (CORDERO, 2013; LEE et al., 2016).

Diante disso, antibióticos como virginamicina, tetraciclina, eritromicina e penicilina têm sido utilizados para controlar essa proliferação bacteriana durante a etapa de fermentação na produção de etanol. Entretanto, existe a preocupação com o aumento da resistência bacteriana a esses antimicrobianos, além do risco de resíduos desses antibióticos no DDGS (THIEX, 2012; COMPART et al., 2013; BISCHOF et al., 2016). Assim, a presença de resíduos de antibióticos no WDG também pode atuar como inibidor

de crescimento para enterobactérias (AKHTAR et al., 2016; ADAMU et al., 2018).

Outro possível contaminante de DG, que pode inibir o crescimento de *E. coli* patogênica, são as micotoxinas (PUI-PUI; MOHD-REDZWAN, 2018). Essas não são destruídas durante o processo de produção do etanol e nem durante a secagem. Se o milho usado para a produção do etanol estiver contaminado, a concentração será três vezes maior no DG (CORDERO, 2013; LEE; HERRMAN, 2016).

Lee e Herrman (2016), ao avaliarem a ocorrência de contaminantes em DG nos EUA durante o período de 2008 a 2014, verificaram que 10% (24/242) das amostras de DDGS de milho apresentaram resíduo de virginiamicina e que 2% (5/242) continham concentração de aflatoxina maior que o limite estabelecido pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA para uso em ração animal. Os autores também reportaram prevalência de 2,5% (4/157) de *Salmonella* spp. em DDGS.

No conhecimento dos autores desse estudo, não existem dados disponíveis sobre contaminantes no DG brasileiro. Assim, sugere-se que a presença de qualquer um desses compostos no WDG pode ter inibido o crescimento de STEC na carcaça dos animais submetidos a dietas contendo o coproduto.

Embora no presente estudo não tenha sido encontrada diferença significativa na ocorrência de STEC nas fezes entre os tratamentos, foi observada alta ocorrência de STEC nas fezes, média de 94,3%, sendo mais alta do que a reportada em estudos anteriores, os quais demonstraram ocorrência de 0,5 a 41,4% (BIBBAL et al., 2015; NOLL et al., 2015; DEWSBURY et al., 2015; MIR et al., 2016; VENEGA-VARGAS et al., 2016; PAQUETTE et al., 2018; PARVEJ et al., 2018). Quanto a pesquisa de STEC na carcaça de bovinos, estudo reportaram ocorrência média de 4,6 % (BRUSA et al., 2017; FONTCUBERTA et al., 2018; STROMBERG et al., 2018), enquanto que no presente estudo a ocorrência média foi de 11,05% (Figura 6).

Esses resultados são alarmantes, pois a alta ocorrência de patógenos em animais de criação constitui em aumento do risco para humanos (SOLLER et al., 2015; UM et al., 2016; KARMALI et al., 2016). Em 2010, a *European Food Safety Authority* (EFSA), ao realizar uma avaliação quantitativa de riscos microbianos (QMRA), demonstrou que a redução na ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos resulta em uma diminuição correspondente na ocorrência do patógeno em humanos. O EFSA verificou que se reduzir de 80 a 90% da ocorrência desse patógeno em linfonodos de suínos consequentemente reduziria de 80 a 90% a ocorrência em humanos, mostrando que a alta prevalência de patógenos em animais de produção influencia diretamente na ocorrência dos mesmos em

humanos.

No presente estudo todas as amostras de fezes foram negativas para *Salmonella* spp. Esses resultados podem ser devido à predileção e capacidade dessa enterobactéria de invadir linfonodos periféricos, que têm sido considerados uma das principais fontes de contaminação de *Salmonella* spp. para a carcaça e carne bovina (LI et al., 2015; WEBB et al., 2017; VOHRA et al., 2018). Além disso, a metodologia de qPCR para pesquisa de *Salmonella* spp. utilizada nesse estudo apresentou pouca sensibilidade analítica, < 100 cópias/ μ L. Estudos anteriores reportaram que a ocorrência de *Salmonella* spp. nas fezes de bovinos variou de 0,5 a 11,5% (SCHMIDT et al., 2014; BARLOW et al., 2015; XIE et al., 2016).

6.3 Implicações do estudo

Os resultados desse estudo sugerem que a silagem de WDG inoculada com *Lactobacillus buchneri* (DSM 13573) e *Lactobacillus plantarum* (DSM 3676 e DSM 3677) pode ter exercido efeito probiótico e ação antimicrobiana contra as enterobactérias patogênicas avaliadas, o que contribuiu para a menor ocorrência de STEC nas carcaças dos animais submetidos a maiores concentrações do copoduto.

Uma vez que, na quase totalidade dos estudos realizados, o crescente uso de DG na dieta de bovinos resulta em maior excreção de patógenos e, conseqüentemente, contaminação da pele e carcaça, o uso de silagem de WDG inoculada com probióticos pode representar solução para este problema relacionado ao uso de DG, além de melhorar a qualidade nutricional da silagem e o desempenho produtivo dos animais.

Por outro lado, devido à alta ocorrência de STEC tanto nas fezes quanto nas carcaças independente do grupo de tratamento, mais estudos são necessários para avaliar a possível seleção de cepas ácido-resistentes, além da realização de análises quantitativas para pesquisa de STEC e *Salmonella* spp., que irão permitir inferências mais assertivas sobre a influência da silagem de WDG inoculada na excreção desses patógenos nas fezes de bovinos, nas condições estabelecidas neste estudo.

Pelo conhecimento dos autores, esse foi o primeiro estudo realizado no mundo sobre a excreção de patógenos nas fezes de bovinos alimentados com silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria, além de ser o primeiro estudo com DG e excreção de patógenos realizado no Brasil. Esses resultados indicam que existe a necessidade de mais pesquisas que gerem subsídios técnico-científicos para recomendar o uso de silagem de WDG inoculada na dieta de bovinos cruzados em confinamentos brasileiros sem afetar a

inocuidade da carne *in natura*, o que irá contribuir para a identificação de estratégias nutricionais que poderão ser empregadas para melhorar a eficiência biológico-econômica de programas de controle de patógenos na carne bovina. Ademais, diante da crescente necessidade mundial pela produção de fontes energéticas renováveis e menos poluentes, espera-se que os resultados desse estudo possam contribuir quanto à destinação e uso adequado do resíduo gerado da produção de etanol de milho.

7 CONCLUSÃO

O aumento nos níveis de inclusão de silagem de WDG na dieta de bovinos machos não castrados, 50% Angus e 50% Nelore, confinados não aumentou a ocorrência e quantificação de indicadores higiênicos e sanitários na carcaça, bem como a ocorrência de patógenos nas fezes e superfície das carcaças. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa na ocorrência de STEC entre os tratamentos, foi observada alta ocorrência desse patógeno nas fezes e nas carcaças em todos os tratamentos.

- 1) A taxa de fermentação do amido não foi menor no intestino grosso dos animais alimentados com dietas contendo 30 e 45% de silagem de WDG quando comparada com os animais submetidos a dietas com 15% do coproduto. Portanto, não foi detectada diferença na excreção de patógenos entre os animais alimentados com 30, 45 e 15% do coproduto;
- 2) A taxa de fermentação do amido não foi maior no intestino grosso dos animais alimentados com dietas contendo 0% de silagem de WDG quando comparada com os animais submetidos a dietas contendo 15, 30 e 45% do coproduto. Portanto, não houve diferença na excreção de patógenos entre os animais alimentados com 0, 15, 30 e 45% de silagem de WDG;
- 3) A contagem de mesófilos nas carcaças não foi diferente entre os tratamentos avaliados;
- 4) A ocorrência e contagem de coliformes totais e *E. coli* não patogênica não foram maiores nas carcaças dos animais alimentados com dietas contendo 30 e 45% de silagem de WDG do que nos animais submetidos a dietas com 0 e 15% do coproduto.

Mais estudos são necessários para compreender se o uso de inoculante na silagem de WDG pode inibir o crescimento de patógenos no TGI e, conseqüentemente, diminuir a ocorrência nas fezes e na carcaça. Se essas hipóteses forem confirmadas, a silagem de DG inoculada pode ser uma alternativa bastante promissora para o uso do coproduto de forma segura e, inclusive, como estratégia de controle de patógenos no rebanho, além do melhor desempenho produtivo dos animais.

REFERÊNCIAS

- ADAMU, M.S.; UGOCHUKWU, I.C.I.; IDOKO, S.I.; KWABUGGE, Y.A.; ABUBAKAR, N.S.A.; AMEH, J.A. Virulent gene profile and antibiotic susceptibility pattern of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from cattle and camels in Maiduguri, North-Eastern Nigeria. **Tropical animal health and production**, p. 1-15, 2018.
- AGGA, G.E.; ARTHUR, T.M.; HINKLEY, S.; BOSILEVAC, J.M. Evaluation of rectoanal mucosal swab sampling for molecular detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in beef cattle. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 4, p. 661-667, 2017.
- AGGA, G.E.; ARTHUR, T.M.; SCHMIDT, J.W.; WANG, R.; BRICHTA-HARHAY, D. M. Diagnostic accuracy of rectoanal mucosal swab of feedlot cattle for detection and enumeration of *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 531-537, 2016.
- AHERN, N.A.; NUTTELMAN, B.L.; KLOPFENSTEIN, T.J.; MACDONALD, J.C.; ERICKSON, G.E.; WATSON, A.K. Comparison of wet and dry distillers grains plus solubles to corn as an energy source in forage-based diets. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, p.758–767, 2016.
- AKHTAR, M.; MASERATI, A.; DIEZ-GONZALEZ, F.; SAMPEDRO, F. Does antibiotic resistance influence shiga-toxigenic *Escherichia coli* O26 and O103 survival to stress environments?. **Food Control**, v. 68, p. 330-336, 2016.
- ALEXANDER, T.W.; BOOKER, C.W.; GOW, S.P.; READ, R.R.; MCALLISTER, T. A. Recovery of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* after storage of bovine feces in Cary-Blair medium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1224-1227, 2009.
- ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 15 ed. Official Method 991.01. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1990a.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 16 ed. Official Method 989.03. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1995a.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 16 ed. Official Method 991.01. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1995c.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 990.12. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012a.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 998.08. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012b.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 19 ed. Official Method 991.14. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012c.

ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; GUERINI, M.N.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers, and diversity of *Escherichia coli* O157: H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 2, p. 280-286, 2007.

ARTHUR, T.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; BOSILEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Super shedding of *Escherichia coli* O157: H7 by cattle and the impact on beef carcass contamination. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 32-37, 2010.

ARTHUR, T.M.; KALCHAYANAND, N.; AGGA, G.E.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Evaluation of bacteriophage application to cattle in lairage at beef processing plants to reduce *Escherichia coli* O157: H7 prevalence on hides and carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 1, p. 17-22, 2017.

BAKER, C.A.; RUBINELLI, P.M.; PARK, S.H.; CARBONERO, F.; RICKE, S.C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**, v.59, p.407-419, 2016.

BARCO, L.; BELLUCO, S.; ROCCATO, A.; RICCI, A. A systematic review of studies on *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* on beef carcasses at the slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 30-39, 2015.

BARHAM, A.R.; BARHAM, B.L.; JOHNSON, A.K.; ALLEN, D.M.; BLANTON, J.R.; MILLER, M.F. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 280-283, 2002.

BARLOW, R.S.; MCMILLAN, K.E.; DUFFY, L.L.; FEGAN, N.; JORDAN, D.; MELLOR, G.E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* from Australian cattle populations at slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 5, p. 912-920, 2015.

BEIER, R.C.; POOLE, T.L.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; ANDERSON, R.C.; BISCHOFF, K.M.; HERNANDEZ, C.A.; BONO, J.M.; ARTHUR, T.M.; NAGARAJA, T.G.; CRIPPEN, T.L.; SHEFFIELD, C.L.; NISBET, D.J. Disinfectant and antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* O157: H7 strains from cattle carcasses, feces, and hides and ground beef from the United States. **Journal of food protection**, v. 76, n. 1, p. 6-17, 2013.

BENJAMIN, L.A.; JAY-RUSSELL, M.T.; ATWILL, E.R.; COOLEY, M.B.; CARYCHAO, D.; LARSEN, R.E.; MANDRELL, R.E. Risk factors for *Escherichia coli* O157 on beef cattle ranches located near a major produce production region. **Epidemiology e Infection**, v. 143, n. 1, p. 81-93, 2015.

BEN-MEIR, Y.A.; JAMI, E.; PORTNIK, Y.; YA'ACOBY, S.; CHEN, Y.; OGUNADE, I. M.; WEINBERG, Z.G. Effect of silage inoculants on the quality of baled whole-crop wheat silages and milking cow performance. **Grassland Science**, 2018.

BERRY, E.D.; WELLS, J.E.; VAREL, V.H.; HALES, K.E.; KALCHAYANAND, N. Persistence of *Escherichia coli* O157: H7 and total *Escherichia coli* in feces and feedlot surface manure from cattle fed diets with and without corn or sorghum wet distillers grains with solubles. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 8, p. 1317-1327, 2017.

BERTÃO, A.M.S.; SARIDAKIS, H.O. *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC): principais fatores de virulência e dados epidemiológicos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 28, n. 2, p. 81-92, 2007.

BIBBAL, D.; LOUKIADIS, E.; KÉROURÉDAN, M.; FERRÉ, F.; DILASSER, F.; DE GARAM, C.P.; BRUGÈRE, H. Prevalence of carriage of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O157: H7, O26: H11, O103: H2, O111: H8, and O145: H28 among slaughtered adult cattle in France. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 4, p. 1397-1405, 2015.

BISCHOFF, K.M.; ZHANG, Y.; RICH, J.O. Fate of virginiamycin through the fuel ethanol production process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 76, 2016.

BLOUNT, Z.D. The natural history of model organisms: The unexhausted potential of *E. coli*. **Elife**, v. 4, p. e05826, 2015.

BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G. Silage fermentation and silage additives-Review. Asian-Australasian **Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 5, p. 483-494, 1996.

BORREANI, G.; TABACCO, E.; SCHMIDT, R.J.; HOLMES, B.J.; MUCK, R.E.L. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.

BOSILEVAC, J.M.; GASSEM, M.A.; AL SHEDDY, I.A.; ALMAIMAN, S.A.; AL-MOHIZEA, I.S.; ALOWAIMER, A.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* in camels, cattle, goats, and sheep harvested for meat in Riyadh. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 89-96, 2015.

BRASIL. Decreto no 9013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial [da] União**, n.62, p. 3, 30 mar. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA, v. 3, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animais/arquivos-publicacoes-dipoa/anuario-dipoa-v3>>. Acesso em: 06 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de

Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018. Disponível em: <
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 06 mar. 2018.

BRICHTA-HARHAY, D.M.; GUERINI, M.N.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 contamination on hides and carcasses of cull cattle presented for slaughter in the United States: an evaluation of prevalence and bacterial loads by immunomagnetic separation and direct plating methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6289-6297, 2008.

BRUSA, V.; RESTOVICH, V.; GALLI, L.; TEITELBAUM, D.; SIGNORINI, M.; BRASESCO, H.; SANZ, M. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. 1-16, 2017.

BUNCIC, S.; NYCHAS, G.; LEE, M.R.F.; KOUTSOUMANIS, K.; HÉBRAUD, M.; DESVAUX, M.; CHORIANOPOULOS, N.; BOLTON, D.; BLAGOJEVIC, B.; ANTIC, D. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v.97, p.288-297, 2014.

BURHOOP, J.E. Evaluation of Distillers Grains Components for Finishing Beef Cattle. 2017. 88f. Dissertação (Mestrado) - College at the University of Nebraska.

CAI, Y.; PANG, H.; TAN, Z.; WANG, Y.; ZHANG, J.; XU, C.; CAO, Y. Application of Lactic Acid Bacteria for Animal Production. In In: Zhang H., Cai Y. (eds) Lactic Acid Bacteria. **Springer**, Dordrecht, 2014. p. 443-491.

CALLAWAY, T.R.; DOWD, S.E.; EDRINGTON, T.S.; ANDERSON, R.C.; KRUEGER, N.; BAUER, N.; NISBET, D.J. Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing 1. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 12, p. 3977-3983, 2010.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; LONERAGAN, G.H.; CARR, M.A.; NISBET, D.J. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. Agriculture. **Food and Analytical Bacteriology Journal**, v. 3, p. 39-69, 2013.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. Métodos de Análises de Alimentos. **FEALQ**, 2004.

CASTELLANO, P.; PÉREZ IBARRECHE, M.; BLANCO MASSANI, M.; FONTANA, C.; VIGNOLO, G. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 38, 2017.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections from hamburgers--western United States, 1992-1993. MMWR. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 42, n.

14, p. 258, 1993.

CDC-HHS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health & Human Services (HHS). *E. coli* Homepage. General Information. Page last updated: November 6, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 2 fev. 2018.

CHANEY, W.E.; MALONEY, R.; JOHNSON, B.J.; BROOKS, J.C.; BRASHEARS, M.M.; LONERAGAN, G.H. Corn-Based Distillers' Grains in Diets for Feedlot Cattle are Associated with the Burden of *Escherichia coli* O157 in Feces. **Foodborne pathogens and disease**, 2018.

CHANNON, A.F.; ROWE, J.B.; HERD, B.M. Genetic variation in starch digestion in feedlot cattle and its association with residual feed intake. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 44, p.469-474, 2004.

CHAPPLE, W.P. et al. Effects of feeding processed corn stover and distillers grains on growth performance and metabolism of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 8, p. 4002-4011, 2015.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, n.3, p.527-538, 2004.

COMPART, D.P.; CARLSON, A.M.; CRAWFORD, G.I.; FINK, R.C.; DIEZ-GONZALEZ, F.; DICOSTANZO, A.; SHURSON, G.C. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. **Journal of animal science**, v. 91, n. 5, p. 2395-2404, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 5, n. 6, 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_mar_co_2018.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2018.

COOLEY, M.B.; JAY-RUSSEL, M.J.; ATWILL, E.R.; CARYCHAO, D.; NGUYEN, B.Q.; PATEL, R.; WALKER, S.; SWIMLEY, M.; PIERRE-JEROME, E.; GORDUS, A.G.; MANDRELL, R.E. Development of a robust method for isolation of Shiga toxin-positive *Escherichia coli* (STEC) from fecal, plant, soil and water samples from a leafy greens production region in California. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65716, 2013.

CORDERO, A. U.S. Grains Council. A GUIDE TO Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS), cap. 9, 10 e 13, 2013.

COSSI, M.V.C.; BURIN, R.C.K.; CAMARGO, A.C.; DIAS, M.R.; LANNA, F.G.P.A.; DE ARRUDA PINTO, P.S.; NERO, L.A. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. **Food Control**, v. 40, p. 320-323, 2014.

COSTA, M. Mais por menos Subproduto do etanol de milho estimula ganho de peso com menor consumo de ração, 2016. Disponível em: <<http://www.portaldbo.com.br/Revista->

DBO/Noticias/Mais-por-menos/16137>. Acesso em: 10 nov. 2017.

COURA, F.M.; FREITAS, M.D.; RIBEIRO, J.; DE LEME, R.A.; DE SOUZA, C.; ALFIERI, A. A.; HEINEMANN, M.B. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, *Rotavirus*, and *Coronavirus* isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2015.

CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems**, p.185-214, 2015.

CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems**, p.185-214, 2015.

CRUZ, T.F.; ARAUJO, J.P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. **Journal of virological methods**, v.196, p.82-85, 2014.

CUMMINGS, K.J.; WARNICK, L.D.; ALEXANDER, K.A.; CRIPPS, C.J.; GRÖHN, Y.T.; MCDONOUGH, P.L.; NYDAN, D.V.; REED, K.E. The incidence of salmonellosis among dairy herds in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3766-3774, 2009.

CUMMINGS, P.L.; KUO, T.; JAVANBAKHT, M.; SHAFIR, S.; WANG, M.; SORVILLO, F. Salmonellosis hospitalizations in the United States: Associated chronic conditions, costs, and hospital outcomes, 2011, trends 2000–2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 1, p. 40-48, 2016.

DARGATZ, D.A.; KOPRAL, C.A.; ERDMAN, M.M.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from cattle feces in United States Feedlots in 2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, n. 9, p. 483-489, 2016.

DEWSBURY, D.M.; RENTER, D.G.; SHRIDHAR, P.B.; NOLL, L.W.; SHI, X.; NAGARAJA, T.G.; CERNICCHIARO, N. Summer and winter prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in feces of feedlot cattle. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 8, p. 726-732, 2015.

DICOSTANZO, A.; CRAWFORD, G. Effect of finishing cattle on low fat distillers grains on animal performance and carcass and meat characteristics. 2013.

DICOSTANZO, A.; WRIGH, C.L. Feeding Ethanol Coproducts to Beef Cattle. In: *Distillers Grains Production, Properties, and Utilization*. Boca Raton: Flórida, 2012. Chap. 12, p. 243-246.

DIEZ-GONZALEZ, F.; CALLAWAY, T.R.; KIZOULIS, M.G.; RUSSELL, J.B. Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*, v. 281, n. 5383, p. 1666-1668, 1998.

DUFFY, G.; BURGESS, C.M.; BOLTON, D.J. A review of factors that effect transmission

and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. **Meat Science**, v.97, p.375-383, 2014.

ECKERT, C.T., et al. Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3907 - 3912, 2018.

EDRINGTON, T.S.; LONERAGAN, G.H.; HILL, J.; GENOVESE, K.J.; HE, H.; CALLAWAY, T.R.; NISBET, D.J. Development of a transdermal *Salmonella* challenge model in calves. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 7, p. 1255-1258, 2013.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk Assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs. **EFSA Journal**, v. 8, n. 4, p. 1547, 2010.

ENG, S.K.; PUSPARAJAH, P.; AB MUTALIB, N.S., SER, H.L.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

ETCHEVERRÍA, A.I.; PADOLA, N.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involved in virulence and cattle colonization. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 366-372, 2013.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Chapter 4A - Diarrheagenic *Escherichia coli*, Updated June 2018. FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM). <Disponível <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryM.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

FERREIRA, M.S.; NIEHUES, M.B.; TOMAZ, L.A.; FOGAÇA, L.A.; PAULINO, P.V.R.; MARTINS, C.L.; ARRIGONI, M.; NETO, O.R.M. Levels of wet distillers grains for F1 Angus-Nellore bulls finished in feedlot: dry matter intake and performance. In: Session 5 – Feed resources and sustainable diets. 2018.

FINK, R.C.; POPOWSKI, J.M.; ANDERSON, J.E.; TRAN, J.L.; KALYANIKUTTY, S.; CRAWFORD, G.I.; DIEZ-GONZALEZ, F. Impact of distillers grain solids (DGS) and seasonality on the prevalence of *Escherichia coli* O157 at an abattoir in the US Upper Midwest. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 237-241, 2018.

FLÁVIA, A. Retrospectiva Canal-2017 / Cresce produção nacional de etanol de milho. Disponível em: <<http://www.canalbioenergia.com.br/etanol-de-milho-mato-grosso-se-destaca-na-producao/>> Acesso em: 10 nov. 2017.

FONTCUBERTA, M.; PLANELL, R.; TORRENTS, A.; SABATÉ, S.; GONZALEZ, R.; RAMONEDA, M.; DE SIMÓN, M. Characterization of Shiga Toxin - Producing *Escherichia coli* O157 Isolates from Bovine Carcasses. **Journal of food protection**, v. 79, n. 8, p. 1418-1423, 2016.

FOX, J.T.; DEPENDBUSCH, B.E.; DROUILLARD, J.S.; NAGARAJA, T.G. Dry-rolled or steam-flaked grain-based diets and fecal shedding of *Escherichia coli* O157 in feedlot cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 5, p. 1207-1212, 2007.

FREEDMAN, S.B.; XIE, J.; NEUFELD, M.S.; HAMILTON, W.L.; HARTLING, L.;

TARR, P. I. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection, Antibiotics, and Risk of Developing Hemolytic Uremic Syndrome: A Meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 10, p. 1251-1258, 2016.

GELLER, L.J. Brazil. Grain and Feed Annual. Low Prices and Large Stocks Impact Corn Producers. Grain Report n°. BR1707. In: USDA Foreign Agricultural Service, 2017.

Disponível em:

<https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Grain%20and%20Feed%20Annual_Brasilia_Brazil_4-6-2017.pdf> Acesso em: 5 mar. 2018.

GHAFFIR, Y.; CHINA, B.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; DAUBE, G. Hygiene indicator microorganisms for selected pathogens on beef, pork, and poultry meats in Belgium.

Journal of Food Protection, v. 71, n. 1, p. 35-45, 2008.

GILBERT, R.A.; TOMKINS, N.; PADMANABHA, J.; GOUGH, J.M.; KRAUSE, D.O.; MCSWEENEY, C.S. Effect of finishing diets on *Escherichia coli* populations and prevalence of enterohaemorrhagic *E. coli* virulence genes in cattle faeces. **Journal of applied microbiology**, v. 99, n. 4, p. 885-894, 2005.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. Uma avaliação de protocolos de purificação de DNA baseados em chelex para a tipagem de bactérias do ácido láctico. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, n.2, p.175-184, 2000.

GIRON, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.254, p.710-713, 1991.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis. Handbook n°. 379, Agricultural Research Service, USDA, Washington, D.C., 1970.

GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z.G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 662-666, 2005.

GOODMAN, L.B.; MCDONOUGH, P.L.; ANDERSON, R.R.; FRANKLIN-GUILD, R.J.; RYAN, J.R.; PERKINS, G.A.; THACHIL, A.J.; GLASER, A.L.; Thompson, B.S. Detection of *Salmonella* spp. in veterinary samples by combining selective enrichment and real-time PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, p. v. 29, n. 6, p. 844-851, 2017.

GOPINATH, S.; CARDEN, S.; MONACK, D. Shedding light on *Salmonella* carriers. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 7, p. 320-327, 2012.

GRAGG, S.E.; LONERAGAN, G.H.; NIGHTINGALE, K.K.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; RUIZ, H.; ELDER, J.R.; BRASHEARS, M.M. Substantial within-animal diversity of *Salmonella* isolates from lymph nodes, feces, and hides of cattle at slaughter. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4744-4750, 2013.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.

GUNN, P.J.; BRIDGES, G.A; LEMENAGER, R.P; SCHOONMAKER, J.P. Feeding corn distillers grains as an energy source to gestating and lactating beef heifers: Impact of excess protein on feedlot performance, glucose tolerance, carcass characteristics and *Longissimus muscle* fatty acid profile of steer progeny. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p. 1364-1371, 2017.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing: An overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p.E45-E62, 2007.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: Eds C. L. GYLES, J. F.; PRESCOTT, J. G.; SINGER, C. O. THOEN. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. **Blackwell Publishing**, p.267-308, 2010.

HALL, M.B.; MERTENS, D.R. A 100 - year review: Carbohydrates - Characterization, digestion, and utilization. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 12, p. 10078-10093, 2017.

HAN, H.; OGATA, Y.; YAMAMOTO, Y.; NAGAO, S.; NISHINO, N. Identification of lactic acid bacteria in the rumen and feces of dairy cows fed total mixed ration silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 9, p. 5754-5762, 2014.

HANLON, K.E.; MILLER, M.F.; GUILLEN, L.M.; ECHEVERRY, A.; DORMEDY, E.; CEMO, B.; LOREE, A.; BRANHAM, L.A.; SANDERS, S.; BRASHEARS, M.M. Presence of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 on the hide, and presence of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157 and *Campylobacter* in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. **Meat Science**, v. 135, p. 1-5, 2018.

HANSON, D.L.; ISON, J.J.; MALIN, K.S.; WEBB, H.E. Salmonella White Paper. In: Beef Industry Food Safety Council (BIFSCo), 2016. Disponível em: <file:///C:/Users/lln/Downloads/BIFSCo_2016_SalmonellaWhitePaper.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2018.

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 35-56, 1993.

HERRING, A.D. North American beef production. In: Beef Cattle Production and Trade. CSIRO: **Australia**, Chap. 5, p. 82-104, 2014.

HO, D.P.; NGO, H.H.; GUO, W.A. mini review on renewable sources for biofuel. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 742-749, 2014.

HUNT, J.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 21-45, 2010.

HUSSEIN, S.; BOLLINGER, L.M. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 10, p. 2224-2241, 2005.

IGLESIAS, M.A.; KRONING, I.S.; DECOL, L.T.; DE MELO FRANCO, B.D.G.; DA

SILVA, W.P. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, v. 100, p. 96 - 101, 2017.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (ISO) 17604:2015 (E). Microbiology of the food chain - Carcass sampling for microbiological analysis. Switzerland, 2015. 13 p.

JACOB, M.E.; FOX, J.T.; NARAYANAN, S.K.; DROUILLARD, J.S.; RENTER, D. G.; NAGARAJA, T.G. Effects of feeding wet corn distillers grains with solubles with or without monensin and tylosin on the prevalence and antimicrobial susceptibilities of fecal foodborne pathogenic and commensal bacteria in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 5, p. 1182-1190, 2008.

JACOB, M.E.; PADDOCK, Z.D.; RENTER, D. G.; LECHTENBERG, K.F.; NAGARAJA, T.G. Inclusion of dried or wet distillers' grains at different levels in diets of feedlot cattle affects fecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7238-7242, 2010.

JÚNIOR, A. Por Dentro do Cocho: Grãos de milho de destilaria – DDG, DDGs, WDG e WDGs, 2017. Disponível em: < <http://www.agroceresmultimix.com.br/blog/por-dentro-do-cocho-graos-de-milho-de-destilaria-ddg-ddgs-wdg-e-wdgs/>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

KANJEE, U.; HOURY, W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 65-81, 2013.

KARMALI, M.A. Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 3, p. 371-376, 2016.

KLOPFENSTEIN, T.J.; ERICKSON, G.E.; BREMER, V.R. Board-invited review: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. **Journal of animal science**, v. 86, n. 5, p. 1223-1231, 2008.

KOOHMARAIE, M.; SCANGA, J.A.; DE LA ZERDA, M.J.; KOOHMARAIE, B.; TAPAY, L.; BESKHLEBNAYA, V.; SAMADPOUR, M. Tracking the sources of *Salmonella* in ground beef produced from nonfed cattle. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 8, p. 1464-1468, 2012.

KUNG, L.; MUCK, R.E. Animal response to silage additives. In: Proceedings of the conference on Silage: Field to feedbunk. **North American Conference Hershey, PA. NRAES-99**. 1997.

LABTOOLS. Bacterial cell number (OD600), 2018. Disponível em: <<http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/>>. Acesso em: 07 jul. 2018.

LAJHAR, S.A.; BROWNLIE, J.; BARLOW, R. Survival capabilities of *Escherichia coli* O26 isolated from cattle and clinical sources in Australia to disinfectants, acids and antimicrobials. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 47, 2017.

- LAUFER, A.S.; GRASS, J.; HOLT, K.; WHICHARD, J.M.; GRIFFIN, P.M.; GOULD, L.H. Outbreaks of *Salmonella* infections attributed to beef - United States, 1973 - 2011. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 9, p. 2003-2013, 2015.
- LEE, K.; HERRMAN, T.J.; POST, L. Evaluation of Selected Nutrients and Contaminants in Distillers Grains from Ethanol Production in Texas. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 9, p. 1562-1571, 2016.
- LEE, Y.H.; AHMADI, F.; CHOI, D.Y.; KWAK, W.S. In situ ruminal degradation characteristics of dry matter and crude protein from dried corn, high-protein corn, and wheat distillers grains. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 33, 2016.
- LEHMKUHLER J.W.; BURRIS, W.R. Distillers Grain Coproducts for Beef Cattle. Agriculture and Natural Resources. In: University of Kentucky College of Agriculture, Lexington, Ky, 40546 ASC-186, 2011. Disponível em: <<http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/asc/asc186/asc186.pdf>>. Acesso em: 8 mar. 2018.
- LI, M.; MALLADI, S.; HURD, H.S.; GOLDSMITH, T.J.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; LONERAGAN, G.H. *Salmonella* spp. in lymph nodes of fed and cull cattle: relative assessment of risk to ground beef. **Food Control**, v. 50, p. 423-434, 2015.
- LIEW, W.H.; HASSIM, M.H.; NG, D.K.S. Review of evolution, technology and sustainability assessments of biofuel production. **Journal of Cleaner Production**, v. 71, p. 11-29, 2014.
- LIEW, W.P.; MOHD-REDZWAN, S. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 60, 2018.
- LINO, F.A. Características Físicas, Químicas e Degradação Ruminal de Grãos de Milho. 2014. 37f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária E Zootecnia, Goiás.
- LIU, K. Chemical Composition of DDGS. In: Distillers Grains Production, Properties, and Utilization. Boca Raton: Florida, 2012. Chap. 8, p. 145-175.
- LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.C.; BERNARDINO, C.D.; AMORIM NETO, H.B.; AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64 - 76, 2016.
- MACHIN, D.; CAMPBELL, M.; FAYERS, P.; PINOL, A. Sample Size Tables for Clinical Studies. Second Ed. Blackwell Science ISBN 0-86542-870-0 p. 18-20, 1997.
- MAJOWICZ, S.E.; SCALLAN, E.; JONES-BITTON, A.; SARGEANT, J.M.; STAPLETON, J.; ANGULO, F. J.; YEUNG, D.H.; KIRK, M. D. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 6, p. 447-455, 2014.

- MALDONADO, N.C.; FICOSECO, C.A.; MANSILLA, F.I.; MELIÁN, C.; HÉBERT, E.M.; VIGNOLO, G.M.; NADER-MACÍAS, M.E.F. Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle. **Livestock Science**, v. 212, p. 99-110, 2018.
- MATOS, A.V.R.; NUNES, L.B.S.; VIANNA, C.; SPINA, T.L.B.; ZUIM, C.V.; POSSEBON, F.S.; XAVIER, D.M.; FERRAZ, M.C.; PINTO, J.P.D.A.N. *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157, *Salmonella* spp., micro-organism indicators in export cattle carcasses. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 981-988, 2013.
- MAYER, C.L.; LEIBOWITZ, C.S.; KUROSAWA, S.; STEARNS-KUROSAWA, D.J. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. **Toxins**, v. 4, n. 11, p. 1261-1287, 2012.
- MCDONALD, J.H. Handbook of biological statistics. Vol. 2. Baltimore, MD: sparky house publishing, 2009.
- MCDONALD, J.H. Handbook of biological statistics. Vol. 3. Baltimore, MD: sparky house publishing, 2012.
- MCFARLAND, Joseph. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **Journal of the American Medical Association**, v. 49, n. 14, p. 1176-1178, 1907.
- MCKIEARNAN, A.; CERNICCHIARO, N.; SANDERSON, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on cattle hides and bacterial transfer from hides to carcasses in Midwestern commercial beef slaughter operations. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 287-287, 2016.
- MCMANUS, C.; BARCELLOS, J.O.J.; FORMENTON, B.K.; HERMUCHE, P.M.; DE CARVALHO, J.O.A.; GUIMARÃES, R.; NETO, J.B. Dynamics of cattle production in Brazil. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. 1 - 15, 2016.
- MEDEIROS, S.R. Etanol de milho e as boas novas para a pecuária de corte, 2018. Disponível em: <<http://www.portaldbo.com.br/Portal/Artigos/Etanol-de-milho-e-as-boas-novas-para-a-pecuaria-de-corte/24166>>. Acesso em: 11 nov. 2017.
- MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; VALENTE, M.S.; XAVIER, C.E.O.; KULAY, L.A.; DONKE, A.C.G.; MATSUURA, M.I.S.F.; RAMOS, N.P.; MORANDI, M.A.B.; BONOMI, A.M.F.L.J.; CAPITANI, D.H.D.; CHAGAS, M.F.; CAVALETT, O.; GOUVÊIA, V.L.R. A produção de etanol pela integração do milho safrinha às usinas de cana de açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. **Revista do BNDES**, v.41, p.147-208, 2014.
- MILIOS, K.T.; DROSINOS, E.H.; ZOIPOULOS, P.E. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria—A review. **Food Control**, v. 43, p. 74-81, 2014.
- MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; DILORENZO, N.; MARTINS, C. L.; MARINO,

- C. T.; BASTOS, J. P. S. T.; MARIANI, R. S.; BARDUCCI, L. M. N.; SARTI, A. DICOSTANZO.; RODRIGUES, P. H. M. Effects of feeding a spray-dried multivalent polyclonal antibody preparation on feedlot performance, feeding behavior, carcass characteristics, rumenitis, and blood gas profile of Brangus and Nellore yearling bulls. **Journal of animal science**, v. 93, n. 9, p. 4387-4400, 2015.
- MILLEN, D.D.; PACHECO, R.D.L.; ARRIGONI, M.D.A.; GALYEAN, M.L.; VASCONCELOS, J.T.A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v.87, n.10, p.3427-3439, 2009.
- MIR, R. A.; WEPPELMANN, T.A.; ELZO, M.; AHN, S.; DRIVER, J.D.; JEONG, K.C.C. Colonization of beef cattle by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* during the first year of life: a cohort study. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2016.
- MOXLEY, R.A.; ACUFF, G.R. Peri-and postharvest factors in the control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. In: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli*. **American Society of Microbiology**, p. 457-476, 2015.
- MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.29-56, 2010.
- MUGHINI-GRAS, L.; ENSERINK, R.; FRIESEMA, I.; HECK, M.; VAN DUYNHOVEN, Y.; VAN PELT, W. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014.
- MUGHINI-GRAS, L.; PELT, W.; VOORT, M.; HECK, M.; FRIESEMA, I.; FRANZ, E. Attribution of human infections with Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) to livestock sources and identification of source specific risk factors, The Netherlands (2010–2014). **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, 2018.
- MUNNS, K.D.; SELINGER, L.B.; STANFORD, K.; GUAN, L.; CALLAWAY, T.R.; MCALLISTER, T.A. Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157: H7 by cattle. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 2, p. 89-103, 2015.
- NASEER, U.; LØBERSLI, I.; HINDRUM, M.; BRUVIK, T.; BRANDAL, L.T. Virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and the risk of developing haemolytic uraemic syndrome in Norway, 1992–2013. **European Journal of Clinical Microbiology e Infectious Diseases**, v. 36, n. 9, p. 1613-1620, 2017.
- NIYONZIMA, E.; ONGOL, M.P.; KIMONYO, A.; SINDIC, M. Risk factors and control measures for bacterial contamination in the bovine meat chain: a review on *Salmonella* and pathogenic *E. coli*. **Journal of Food Research**, v. 4, n. 5, p. 98, 2015.
- NOCEK, J.E.; HART, S.P.; POLAN, C.E. Rumen ammonia concentrations as influenced by storage time, freezing and thawing, acid preservative, and, method of ammonia determination. **Journal Dairy Science**, v. 70, o. 607, 1987.
- NOLL, L.W.; SHRIDHAR, P.B.; DEWSBURY, D.M., SHI, X.; CERNICCHIARO, N.;

RENTER, D.G.; NAGARAJA, T.G. A comparison of culture-and PCR-based methods to detect six major non-O157 serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle feces. **PloS one**, v. 10, n. 8, p. 1-12, 2015.

NRC. 2016. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle (chapter 17): Eighth Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/19014>.

OGUNADE, I.M.; JIANG, Y.; KIM, D.H.; CERVANTES, A.P.; ARRIOLA, K.G.; VYAS, D.; ADESOGAN, A.T. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 3, p. 1780-1794, 2017.

OGUNADE, I.M.; KIM, D.H.; JIANG, Y.; WEINBERG, Z.G.; JEONG, K.C.; ADESOGAN, A.T. Control of *Escherichia coli* O157: H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4427-4436, 2016.

OLAFSON, P.U.; BROWN, T.R.; LOHMEYER, K.H.; HARVEY, R.B.; NISBET, D. J.; LONERAGAN, G.H.; EDRINGTON, T.S. Assessing transmission of *Salmonella* to bovine peripheral lymph nodes upon horn fly feeding. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 7, p. 1135-1142, 2016.

OLIVEIRA, C.A; MILLEN, D.D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, 64 - 75, 2014.

OWENS, F.; BASALAN, M. RUMINAL FERMENTATION. In: MILLEN, D.; ARRIGONI, M.B.; PACHECO, R.D.L. Rumenology: **Springer International** Publishing, cap. 3, p.63-102, 2016.

PADDOCK, Z.D.; RENTER, D.G.; SHI, X.; KREHBIEL, C.R.; DEBEY, B.; NAGARAJA, T.G. Effects of feeding dried distillers grains with supplemental starch on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally inoculated steers. **Journal of animal science**, v. 91, n. 3, p. 1362-1370, 2013.

PAINTER, J.A.; HOEKSTRA, R M.; AYERS, T.; TAUXE, R V.; BRADEN, C.R.; ANGULO, F.J.; GRIFFIN, P.M. Attribution of foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998–2008. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 3, p. 407, 2013.

PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acid in lactating dairy cows fed high fat diets. **Journal Dairy Science**, v. 54, p. 1025, 1971.

PAQUETTE, S.J.; STANFORD, K.; THOMAS, J.E.; REUTER, T. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, *Escherichia coli* O178 and O157 in feces of western-Canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. 1-13, 2018.

PARISH, J.A.; RIVERA, J.D.; BOLAND, H.T. Understanding the ruminant animal digestive system. 2009.

- PARVEJ, M.S.; MAMUN, M.; HASSAN, J.; MAHMUD, M.M.; RAHMAN, M.; TANVIR, M.; NAZIR, K. N.H. Prevalence and characteristics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from beef slaughterhouse. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 5, n. 2, p. 218-225, 2018.
- PASIAKOS, S.M.; AGARWAL, S.; LIEBERMAN, H.R.; FULGONI, V.L. Sources and amounts of animal, dairy, and plant protein intake of US adults in 2007 - 2010. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 7058 - 7069, 2015.
- PETRUZZELLI, A.; OSIMANI, A.; PASQUINI, M.; CLEMENTI, F.; VETRANO, V.; PAOLINI, F.; FOGLINI, M.; MICCI, E.; PAOLONI, A.; ONUCCI, F. Trends in the microbial contamination of bovine, ovine and swine carcasses in three small-scale abattoirs in central Italy: A four-year monitoring. **Meat science**, v. 111, p. 53-59, 2016.
- PINTO, A.C.J.; MILLEN, D.D. Situação atual da engorda de bovinos em confinamento e modelos nutricionais em uso. In: Sebastião de Campos Valadares Filho et al. (Org.). **Simpósio de Produção de Gado de Corte (X Simcorte)**. 1 ed. Viçosa/MG:UFV, v.1, p.103-120, 2016.
- POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 313-321, 2012.
- PRYCE, J.D. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1151-1152, 1969.
- QUEIROZ, O.C.M.; OGUNADE, I.M.; WEINBERG, Z.; ADESOGAN, A.T. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4132-4142, 2018.
- RABELO, C.H.; VALENTE, A.L.; BARBERO, R.P.; BASSO, F.C.; REIS, R.A. Performance of finishing beef cattle fed diets containing maize silages inoculated with lactic-acid bacteria and *Bacillus subtilis*. **Animal Production Science**, 2018.
- RABELO, C.H.S.; BASSO, F.C.; MCALLISTER, T.A.; LAGE, J.F.; GONÇALVES, G.S.; LARA, E.C.; REIS, R.A. Influence of *Lactobacillus buchneri* as silage additive and forage: concentrate ratio on the growth performance, fatty acid profile in *Longissimus muscle*, and meat quality of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 4, p. 550-562, 2016.
- ROSENTRATER, K.A. Overview of Fuel Ethanol Production and Distillers Grains. In: **Distillers grains production, properties, and utilization**. Boca Raton: Florida, 2012. Chap. 2, p. 7-30.
- ROSENTRATER, K.A.; ILELEJI, K.; JOHNSTON, D.B. Manufacturing of Fuel Ethanol and Distillers Grains - Current and Evolving Processes. In: **Distillers grains production, properties, and utilization**. Boca Raton: Florida, 2012. Chap. 5, p. 73-99.
- ROTHMAN, K.J.; GREENLAND, S.; LASH, T.L. Types of epidemiologic

studies. **Modern epidemiology**, v. 3, p. 95-7, 1998.

RUBY, J.R.; ZHU, J.; INGHAM, S.C. Using indicator bacteria and *Salmonella* test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 12, p. 2732-2740, 2007.

SAEEDI, P.; YAZDANPARAST, M.; BEHZADI, E.; SALMANIAN, A. H.; MOUSAVI, S.L.; NAZARIAN, S.; AMANI, J.L. A review on strategies for decreasing *E. coli* O157: H7 risk in animals. **Microbial pathogenesis**, v. 103, p. 186-195, 2017.

SALIM, H.; WOOD, K.M.; CANT, J.P.; SWANSON, K.C. Influence of feeding increasing levels of dry or modified wet corn distillers grains plus solubles in whole corn grain-based finishing cattle diets on pancreatic α -amylase and trypsin activity. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 294-298, 2016.

SAMUELSON, K.L.; HUBBERT, M.E.; GALYEAN, M.L.; LOEST, C.A. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2015 New Mexico state and Texas Tech university survey. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 2648 – 2663, 2016.

SANS, P.; COMBRIS, P. World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961–2011). **Meat Science**, v. 109, p. 106-111, 2015.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7, 2011.

SCHEINBERG, J.A.; DUDLEY, E.G.; CAMPBELL, J.; ROBERTS, B.; DIMARZIO, M.; DEBROY, C.; CUTTER, C. N. Prevalence and Phylogenetic Characterization of *Escherichia coli* and Hygiene Indicator Bacteria Isolated from Leafy Green Produce, Beef, and Pork Obtained from Farmers' Markets in Pennsylvania. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 2, p. 237-244, 2017.

SCHMIDT, J.W.; AGGA, G.E.; BOSILEVAC, J.M.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; SHACKELFORD, S.D.; WANG, R.; ARTHUR, T.M. Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the beef cattle production and processing continuum. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 03079-14, 2014.

SCHNEIDER, L.G.; KLOPFENSTEIN, T.J.; STROMBERG, Z.R.; LEWIS, G.L.; ERICKSON, G.E.; MOXLEY, R. A.; SMITH, D.R. A randomized controlled trial to evaluate the effects of dietary fibre from distillers grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* detection from the rectoanal mucosa and hides of feedlot steers. **Zoonoses and public health**, v. 65, n. 1, p. 124-133, 2018.

SEGURA, A.; AUFFRET, P.; BIBBAL, D.; BERTONI, M.; DURAND, A.; JUBELIN, G.; KÉROURÉDAN, M.; BRUGÈRE, H.; BERTIN, Y.; FORANO, E. Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 375, 2018.

SHARMA, M. Lytic bacteriophages: potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce. **Bacteriophage**, v. 3, n. 2, p. 255-18, 2013.

SILVA, J. R.; NETTO, D. P.; SCUSSEL, V. Maria. Grãos secos de destilaria com solúveis, aplicação em alimentos e segurança: uma revisão. **Pubvet**, v. 10, p. 190-270, 2016.

SMITH, D.R. Preharvest Food Safety Challenges in Beef and Dairy Production. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

SOLLER, J.; BARTRAND, T.; RAVENSCROFT, J.; MOLINA, M.; WHELAN, G.; SCHOEN, M.; ASHBOLT, N. Estimated human health risks from recreational exposures to stormwater runoff containing animal faecal material. **Environmental modelling & software**, v. 72, p. 21-32, 2015.

SOUZA, C.D.O.; MELO, T.R.B.; MELO, C.D.S.B.; MENEZES, Ê.M.; CARVALHO, A.C.D.; MONTEIRO, L.C.R. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreioiônica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.7, n.2, p.79-91, 2016.

SRISHESHARAM, S.; PARK, H.S.; SOUNDHARRAJAN, I.; KUPPUSAMY, P.; KIM, D.H.; JAYRAAJ, I.A.; CHOI, K.C. Evaluation of probiotic *Lactobacillus plantarum* against foodborne pathogens and its fermentation potential in improving *Lolium multiflorum* silage quality. **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 443, 2018.

STROMBERG, Z.R.; REDWEIK, G.A.J; MELLATA, M. Detection, prevalence, and pathogenicity of Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle hides and carcasses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 15, n. 3, p. 119-131, 2018.

SU, Y.; ZHANG, P.; SU, Y. An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.50, p. 991 - 1003, 2015.

SWAGGERTY, C.L.; CORCIONIVOSCHI, N.; RICKE, S.C.; CALLAWAY, T.R. The First 30 Years of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Cattle Production: Incidence, Preharvest Ecology, and Management. In: **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, p. 117-131, 2018.

TARR, P.I.; GORDON, C.A.; CHANDLER, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v. 365, n. 9464, p. 1073-1086, 2005.

THIEX, N. Analytical Methodology for Quality Standards and Other Attributes of DDGS. In: **Distillers grains production, properties, and utilization**. Boca Raton: Florida, 2012. Chap. 10, p. 205-212.

TOMASEVIC, I.; KUZMANOVIĆ, J.; ANĐELKOVIĆ, A.; SARAČEVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M. M.; DJEKIC, I. The effects of mandatory HACCP implementation on microbiological indicators of process hygiene in meat processing and retail establishments in Serbia. **Meat Science**, v. 114, p. 54-57, 2016.

UM, M.M.; BARRAUD, O.; KÉROURÉDAN, M.; GASCHET, M.; STALDER, T.;

OSWALD, E.; BIBBAL, D. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. **Water research**, v. 88, p. 30-38, 2016.

USDA. United States Department of Agriculture. Overview of the United States Cattle Industry, 2016. Disponível em:
<<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/USCatSup/USCatSup-06-24-2016.pdf>>. acesso em: 5 mar. 2018.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pre-Harvest Management Controls and Intervention Options for Reducing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding in Cattle: An Overview of Current Research – August 2014. Disponível em:
<<https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d5314cc7-1ef7-4586-bca2f2ed86d9532f/Reducing-EcoliShedding-in-Cattle.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

UYENO, Y.; SHIGEMORI, S.; SHIMOSATO, T. Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. **Microbes and environments**, v. 30, n. 2, p. 126-132, 2015.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

VAN-BAALE, M.J.; SARGEANT, J.M., GNAD, D.P.; DEBEY, B.M., LECHTENBERG, K.F.; NAGARAJA, T.G. Effect of forage or grain diets with or without monensin on ruminal persistence and fecal *Escherichia coli* O157: H7 in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5336-5342, 2004.

VENEGAS-VARGAS, C.; HENDERSON, S.; KHARE, A.; MOSCI, R.E.; LEHNERT, J.D.; SINGH, P.; OUELLETTE, L.M.; NORBY, B.; FUNK, J.A.; RUST, S.; BARLLETT, P.C.; GROOMS, D.; MANNING, S. D. Factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 16, p. 5049-5056, 2016.

VILA, J.; SÁEZ-LÓPEZ, E.; JOHNSON, J.R.; RÖMLING, U.; DOBRINDT, U.; CANTÓN, R.; GISKE, C.G.; NAAS, T.; CARATTOLI, A.; MARTÍNEZ-MEDINA, M.; BOSCH, J.; RETAMAR, P.; RODRÍGUEZ-BANO, J.; BAQUERO, F.; SOTO, S.M. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 4, p. 437-463, 2016.

VOHRA, P.; BUGAREL, M.; TURNER, F.; LONERAGAN, G.H.; HOPE, J.C.; HOPKINS, J.; STEVENS, M.P. Quantifying the survival of multiple *Salmonella enterica* serovars in vivo via massively parallel whole-genome sequencing to predict zoonotic risk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. e02262-17, 2018.

WEBB, H.E.; BRICHTA-HARHAY, M.; BRASHEARS, M.M.; NIGHTINGALE, K.K.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; KALCHAYANAND, N.; SCHMIDT, J.W.; WANG, R.; GRANIER, S.A.; BROWN, T.R.; EDRINGTON, T.S.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; LONERAGAN, G.H. *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of

Healthy Cattle at Slaughter. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 53-68, 1996.

WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E.; WEIMER, P.J.; CHEN, Y.; GAMBURG, M. Lactic acid bacteria used in inoculants for silage as probiotics for ruminants. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 1-9, 2004.

WEINBERG, Z.G.; WEINBERG, Z.G.; CHEN, Y.; VOLCHINSKI, V.; SELA, S.; OGUNADE, I.M.; ADESOGAN, A. An in vitro model to study interactions between *Escherichia coli* and lactic acid bacterial inoculants for silage in rumen fluid. **Letters in applied microbiology**, v. 63, n. 1, p. 60-65, 2016.

WELLS, J.E.; SHACKELFORD, S.D.; BERRY, E.D.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M.; WHEELER, T.L. Impact of reducing the level of wet distillers grains fed to cattle prior to harvest on prevalence and levels of *Escherichia coli* O157: H7 in feces and on hides. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 10, p. 1611-1617, 2011.

WELLS, J.E.; SHACKELFORD, S.D.; BERRY, E.D.; KALCHAYANAND, N.; GUERINI, M.N.; VAREL, V.H.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; FREETLY, H.C.; WHEELER, T.L.; FERRELL, C. L. Prevalence and level of *Escherichia coli* O157: H7 in feces and on hides of feedlot steers fed diets with or without wet distillers grains with solubles. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 8, p. 1624-1633, 2009.

WHEELER, T. L.; KALCHAYANAND, Norasak; BOSILEVAC, Joseph M. Pre-and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the US beef industry. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 372-382, 2014.

WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 131-135, 1977.

WILHELM, B.J.; YOUNG, I.; CAHILL, S.; NAKAGAWA, R.; DESMARCHELIER, P.; RAJIĆ, A. Rapid systematic review and meta-analysis of the evidence for effectiveness of primary production interventions to control *Salmonella* in beef and pork. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 147, p. 213-225, 2017.

WISENER, L.V.; SARGEANT, J.M.; O'CONNOR, A.M.; FAIRES, M.C.; GLASS-KAASTRA, S.K. The use of direct-fed microbials to reduce shedding of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a systematic review and meta-analysis. **Zoonoses and public health**, v. 62, n. 2, p. 75-89, 2015.

XIE, Y.; SAVELL, J.W.; ARNOLD, A.N.; GEHRING, K.B.; GILL, J.J.; TAYLOR, T.M. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* and *Salmonella bacteriophages* recovered from beef cattle feedlots in south Texas. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 8, p. 1332-1340, 2016.

YOUNG, I.; WILHELM, B.J.; CAHILL, S.; NAKAGAWA, R.; DESMARCHELIER, P.; RAJIĆ, A. Rapid systematic review and meta-analysis of the evidence for effectiveness of primary production interventions to control *Salmonella* in beef and pork. **Preventive**

Veterinary Medicine, 2016.

ZAMORA-SANABRIA, R.; ALVARADO, A.M. Preharvest Salmonella Risk Contamination and the Control Strategies. In: **Current Topics in *Salmonella* and Salmonellosis**. In: Tech, 2017.

ARTIGO CIENTÍFICO

Trabalho enviado para a revista Archives of Veterinary Science. Normas para publicação disponíveis em:

<<https://revistas.ufpr.br/veterinary/about/submissions#authorGuidelines>>

Excreção de patógenos e inocuidade da carcaça de bovinos alimentados com silagem de grãos úmidos de destilaria

Pathogens shedding and carcasses safety of cattle fed with distillers wet grains silage

EXCREÇÃO DE PATÓGENOS E INOCUIDADE DA CARÇAÇA DE BOVINOS ALIMENTADOS COM SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE DESTILARIA

(Pathogens shedding and carcasses safety of cattle fed with distillers wet grains silage)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a excreção de patógenos e inocuidade da carcaça de bovinos alimentados com diferentes níveis de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG). Um total de 100 bovinos machos não castrados, 50% Angus e 50% Nelore, foram divididos aleatoriamente entre quatro dietas (N = 25) compostas por diferentes níveis de silagem de WDG (0, 15, 30 e 45%). Amostras de fezes foram colhidas por meio de suabe da junção reto anal para determinar as ocorrências e quantificação de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *Salmonella* spp. por meio da técnica qPCR. Logo após o abate, a ocorrência e a contagem de *E. coli* não patogênica, coliformes totais e bactérias aeróbias mesófilas, assim como, a ocorrência de STEC, EPEC e *Salmonella* spp., foram determinados a partir de amostras colhidas por meio de esponja da superfície das carcaças das regiões do coxão, flanco, peito e pescoço. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico SAS 9.4 considerando um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre os tratamentos para a ocorrência e contagem de coliformes totais e *E. coli* não patogênica, assim como para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de carcaças ($P > 0,05$). A ocorrência de STEC nas fezes foi de 91,7, 95,7, 100 e 92% e nas carcaças de 20,4, 12,8, 7,3 e 3,7% nos tratamentos 0, 15, 30 45% de WDG, respectivamente ($P > 0,05$). Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. Em conclusão,

a inclusão de WDG na dieta não influenciou no aumento da ocorrência de patógenos nas fezes e carcaças de bovinos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, contaminação, fezes, *Salmonella*, STEC, EPEC, WDG.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the pathogen excretion and carcass safety of cattle fed different levels of inoculated silage from degreased wet distillery grains (WDG). A total of 100 male, 50% Angus and 50% Nelore male bulls were randomly divided into four diets (N = 25) composed of different levels of WDG silage (0, 15, 30 and 45%). Stool specimens were collected by rectal anal junction swab to determine the occurrences and quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), *E. coli* enteropathogenic (EPEC) and *Salmonella* spp. by the qPCR technique. Samples of faeces from each animal on the corral floor were also collected immediately after defecation, which were submitted to physical-chemical analysis. Immediately after slaughtering, the occurrence *E. coli*, total coliforms, and mesophilic aerobic bacteria, as well as the occurrence of STEC, EPEC and *Salmonella* spp., were determined from samples collected by medium of the surface of the carcasses of the regions of the tail, flank, chest and neck. All statistical analyzes were performed in SAS 9.4 statistical software considering a significance level of 5%. The results showed that there was no difference between treatments for the occurrence and counts of total coliforms and non-pathogenic *E. coli*, as well as for the counting of mesophilic aerobic bacteria in the carcass samples ($P > 0.05$). The occurrence of stool STEC was 91.7, 95.7, 100 and 92% and in the carcasses of 20.4, 12.8, 7.3 and 3.7% in treatments 0, 15, 30, 45% of WDG, respectively ($P >$

0.05). All samples were negative for *Salmonella* spp. In conclusion, the inclusion of WDG in the diet did not influence in the increase of the pathogen occurrence in the feces and bovine carcasses.

Key words: *Bos indicus*, contamination, feces, *Salmonella*, STEC, EPEC, WDG.

INTRODUÇÃO

Salmonella spp. e as *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e enteropatogênicas (EPEC) são os principais perigos biológicos associados à contaminação da carne bovina *in natura*. Os bovinos são considerados reservatórios assintomáticos de STEC e estão relacionados à maioria dos surtos e óbitos de humanos (Mughini-Gras et al. 2018). Em relação à *Salmonella* spp., embora seja mais comum nas cadeias produtivas de aves e suínos, os sorotipos mais frequentes em infecções humanas também podem ser isolados de bovinos (Mughini-Gras et al., 2014; Iglesias et al., 2017).

Durante o abate bovino, a pele é a principal fonte de transmissão de STEC e *Salmonella* spp. para a carcaça e sua contaminação está relacionada com o aumento da excreção desses patógenos nas fezes, sobretudo, no período pré-abate (Mckiearnan et al., 2016; Arthur et al., 2017). Diversos fatores têm sido associados com o aumento dessa excreção, incluindo principalmente a sazonalidade (Venegas-Vargas et al., 2016; Webb et al., 2017), idade (Mir et al., 2016) e dieta (Jacob et al., 2010; Berry et al., 2017).

Em relação à dieta, diante da expansão da indústria de etanol de milho no Brasil aliada ao contínuo crescimento e competitividade do mercado de nutrição animal, o uso de grãos de destilaria (*Distillers Grains* - DG), coproduto da fermentação de etanol de milho, na nutrição de bovinos de corte tem aumentado no

país (Costa, 2016; Silva et al., 2016). Entretanto, estudos realizados em outros países demonstraram que bovinos alimentados com dietas contendo DG apresentam maior excreção de *E. coli* patogênica nas fezes do que bovinos alimentados com dietas sem DG (Berry et al., 2017; Fink et al., 2018).

O principal mecanismo envolvido no aumento dessa excreção se deve ao coproduto apresentar alta degradação no rúmen, o que faz com que ocorra o aumento do pH e diminuição na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) no intestino grosso (Jacob et al., 2010; Edrington et al., 2013). Esse processo cria condições favoráveis para o crescimento e multiplicação de STEC e *Salmonella* spp. no intestino grosso e junção reto anal, locais de predileção dessas enterobactérias (Callaway et al., 2013; Crossland et al., 2015).

Nos EUA, os sistemas de produção de carne bovina caracterizam-se pela predominância de animais *Bos taurus* mantidos em confinamentos, onde recebem dietas com altas concentrações de grãos (USDA, 2016). Enquanto que no Brasil, os sistemas produtivos são caracterizados pela dependência quase que exclusiva de pastagens, principalmente para cria e recria de bovinos, assim como, para a terminação de quase 80% do rebanho. Além disso, existe o predomínio de animais *Bos indicus*, cerca de 90% dos bovinos, principalmente com características da raça Nelore, que correspondem a aproximadamente 80% do rebanho de corte brasileiro (Oliveira e Millen, 2014; Mcmanus et al., 2016). Essas diferenças entre as raças predominantes nos EUA e Brasil são importantes principalmente em relação à capacidade de metabolização do amido.

Além dessas diferenças raciais, as características predominantes nas práticas de nutrição adotadas nos EUA são diferentes das que ocorrem no Brasil, sobretudo, no que diz respeito ao tipo de processamento do milho e composição da dieta

(Oliveira e Millen, 2014; Samuelson et al., 2016), nível de inclusão de DG (Samuelson et al., 2016; Costa, 2016) e características do grão de milho (Lino, 2014; Lee et al., 2016). Quanto menos processado for o grão de milho, como ocorre no Brasil, quebrado e moído fino, menor será a degradação de amido no rúmen e maior será a degradação pós-rúmen. Isso ocorre devido a maior quantidade de amido que será degradado no intestino grosso, o que leva ao aumento na concentração de AGV e diminuição do pH nesse local (Fox et al., 2007; Oliveira; Millen, 2014). Além disso, o grão de milho produzido no Brasil possui mais zeína do que o grão dos EUA. Essa proteína está associada com a “vitreosidade” e com a textura do grão. Portanto, os grãos brasileiros são mais “vitreos” e duros do que os grãos americanos, o que confere menor degradação de amido no rúmen (Lino, 2014; Lee et al., 2016).

Diante das diferenças nas características produtivas e, principalmente, nas condições dietéticas praticadas no Brasil, assim como a forma como o coproduto é fornecido, ensilado, inoculado e desengordurado, é inadequado extrapolar os conhecimentos existentes sem a realização de estudos nacionais que demonstrem a influência do DG na excreção de patógenos nas fezes de bovinos de corte no cenário produtivo da pecuária nacional. Desta forma, o objetivo geral desse projeto foi determinar a excreção de patógenos e a inocuidade da carcaça de bovinos cruzados (F1 Angus x Nelore) submetidos a dietas com alto teor de energia confinamento com diferentes níveis de grãos úmidos de destilaria (WDG). Os resultados desse estudo servirão de subsídios técnico-científicos para recomendar o uso de DG na dieta de bovinos cruzados em confinamentos brasileiros sem prejudicar a inocuidade da carne *in natura*.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

O presente estudo foi conduzido no confinamento experimental do Departamento de Melhoramento de Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP – Botucatu/SP. Foram selecionados 100 bovinos machos não castrados, F1 Angus x Nelore, com peso inicial médio de 369,9 kg, idade de 1 ano e 6 meses. Quatro diferentes dietas foram utilizadas, contendo 0, 15, 30 ou 45% de silagem de WDG.

Os animais foram distribuídos em baias coletivas (5 animais por baia), sendo utilizadas 5 baias por tratamento. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados e o fator de blocagem foi o peso corporal inicial. Foram utilizados cinco blocos, sendo que em cada bloco foram realizadas cinco repetições por tratamento.

Posteriormente teve início o protocolo de adaptação, utilizando o modelo Step-up, às dietas com alto teor de energia. O período de adaptação teve duração total de 22 dias. Em seguida iniciou-se o período de terminação, no qual os animais foram submetidos às dietas demonstradas na Tabela 1. Após 132 dias de experimento, os animais foram abatidos em um frigorífico localizado no estado de São Paulo, sob inspeção federal (Brasil, 2017).

Tabela 1 - Ingredientes e conteúdo nutricional das dietas oferecidas no período de terminação

	Tratamentos (% WDG ¹)			
	0	15	30	45
Ingredientes (% MS²)				
Bagaço de cana	7,16	7,11	7,11	7,11
Feno de Tifton-85	4,20	4,20	4,20	4,20
Milho moído	74,88	65,26	52	38,73
Farelo de Soja	10,33	4,77	2,93	1,09
Silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG)	-	15	30	45
Cloreto de Potássio	-	0,23	0,34	0,45
Núcleo mineral vitamínico ³	3,42	3,42	3,42	3,42
Conteúdo nutricional (% MS²)				
Proteína bruta	14,84	16,18	19,11	22,04
Fibra em detergente neutro	16,22	23,45	30,82	38,2
Fibra em detergente neutro-volumoso	9,05	9,00	9,00	9,00
Extrato etéreo	3,42	3,57	3,63	3,69
Carboidrato não fibroso	62,76	54,04	43,43	32,83
ELg (Mcal/Kg MS) ⁴	1,30	1,29	1,27	1,26

¹ *Wet Distillers Grains*

² Conteúdo nutricional em porcentagem da matéria seca estimado pelo software da Cargill.

³ Composição: Ca (mín) 190,00 g/Kg, Ca (máx) 200,00 g/Kg, P (mín) 16,00 g/Kg, S (mín) 19,00 g/Kg, Mg (mín) 15,00 g/Kg, Na (mín) 45,00 g/Kg, Fe (mín) 286,00 mg/Kg, Cu (mín) 428,00 mg/Kg, Mn (mín) 1285,00 mg/Kg, Zn (mín) 1715,00 mg/Kg, I (mín) 25,00 mg/Kg, Co (mín) 8,60 mg/Kg, Se (mín) 5,70 mg/Kg, Cr (mín) 6,60 mg/Kg, NNP. Eq. PB 324,00 g/kg, Monensina 945,00 mg/Kg, *Saccharomyces Cerevisiae* 85,50 UFC/kg, Vit. A 86,00 KUI/kg, Vit. D 11,50 KUI/kg e Vit. E.

⁴ Energia Líquida de ganho

Colheita de amostras

Para análise qPCR qualitativa de STEC e *Salmonella* spp., as amostras foram colhidas por meio da técnica de suabe da mucosa reto anal (Agga et al., 2016; Agga et al., 2017), utilizando uma luva de procedimento por animal. Cada suabe foi armazenado em tubo de ensaio contendo meio de transporte Cary Blair (CB) (Laborclin) (Alexander et al., 2009). Para análise físico-química, amostras de fezes de cada animal foram colhidas do piso do curral logo após defecação e acondicionadas em embalagens plásticas para posterior análise.

A amostragem das meias carcaças esquerdas foi realizada dentro da câmara de resfriamento logo após o abate, utilizando método não destrutivo por esponja, conforme instruções da ISO 17604:2015 (ISO, 2015).

Análises microbianas

As amostras de carcaça foram adicionadas de 15 mL de solução, para obtenção do volume final de 25 mL de solução contendo 0,1% de peptona (LP0037, Oxoid) e 0,85% de NaCl (Dinâmica) (SSP 0,1%), conforme recomendações da ISO 17604:2015 (ISO, 2015). Todas as amostras (N = 97) foram analisadas para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, ocorrência e contagem de *E. coli* não patogênica e de coliformes totais de acordo com os métodos descritos pelo *Official Methods of Analysis* (AOAC, 2012). Os resultados foram apresentados em unidades formadoras de colônia (UFC) por cm². O limite de detecção foi de 0,0625 UFC/cm².

Análises físico-químicas das fezes

Foram realizadas das amostras colhidas as análises de determinação de ácidos graxos voláteis (AGV) (acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico), determinação de ácido lático, amido, proteína bruta (PB), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) e pH. As análises foram realizadas de acordo com metodologias descritas no Manual de Métodos de Análise de Alimentos (FEALQ) (Campos et al., 2004).

Uma alíquota de 10 mL de cada esponja de carcaça mantidas em SSP 0,1% foi enriquecida com 50 mL de Caldo Soja Trypticaseína modificado (CM0989, Oxoid) (TSBm), seguido de homogeneização em equipamento de homogeneização de amostras e incubado a 36 ± 1 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. Uma alíquota de 1500 µL da cultura enriquecida foi armazenada em microtubos a -20 °C até realização das análises moleculares.

Para análise de Reação em Cadeia da Polimerase (qPCR) de STEC e *Salmonella* spp. foram realizados seguindo os procedimentos de acordo com Cooley

et al. (2013) e o protocolo baseado na metodologia descrita por Giraffa et al. (2000) foi adotado para a extração do DNA das amostras de suabe da junção reto anal e de esponja de carcaça mantidas em meios de cultura (TT+n e TSBm). Todas as análises de Reação em Cadeia da Polimerase qualitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento 7500 *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) com o 7500 Software v.2.3 (Applied Biosystems).

Processamento estatístico

O processamento estatístico dos resultados foi realizado no software estatístico SAS 9.4 TS1M2 (SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando um nível de significância de 5%, ou seja, valor $P < 0,05$. Todas as variáveis respostas (parâmetros) foram analisadas com modelos lineares mistos (Proc Mixed) e mistos generalizados (Proc Glimmix).

RESULTADOS

Indicadores higiênicos e sanitários na superfície das carcaças

As ocorrências globais de coliformes e *E. coli* não patogênica nas carcaças foram de 28,9 e 24,7%, respectivamente. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a ocorrência de coliformes ($P = 0,1826$) e *E. coli* não patogênica ($P = 0,3136$) (Figura 1). Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a média dos indicadores higiênicos e sanitários na superfície das carcaças (Tabela 2).

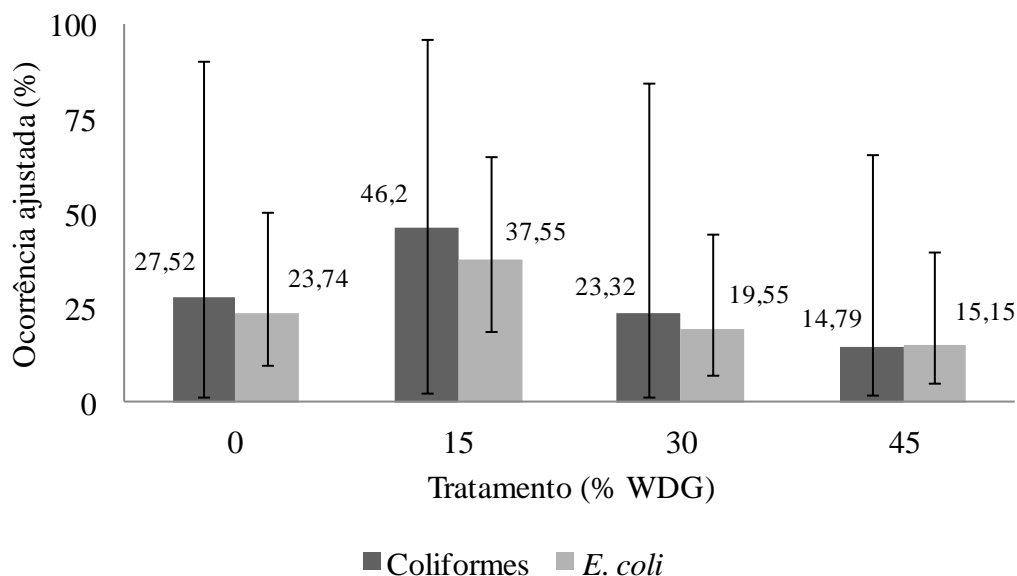


Figura 1 - Ocorrência ajustada e IC 95% de coliformes totais e *E. coli* não patogênica na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

Tabela 2 - Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis avaliadas na superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

Variável log UFC/100cm ² *	Tratamentos (% WDG) ¹				EPM ²	Valor P
	0	15	30	45		
Aeróbios Mesófilos	3,73	4,00	3,67	3,76	0,10	0,1620
Coliformes totais						
Todas ³	1,02	0,95	0,88	0,92	0,11	0,5896
Positivas ⁴	1,55	1,13	1,15	1,54	0,24	0,2792
<i>E. coli</i> não patogênica						
Todas ⁵	0,93	0,91	0,87	0,90	0,09	0,8988
Positivas ⁶	1,31	1,08	1,15	1,41	0,27	0,7542

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Erro padrão médio.

³ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio de coliformes totais de todas as amostras de carcaça (N = 97).

⁴ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das amostras positivas para coliformes totais (N = 28).

⁵ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio de *E. coli* não patogênica de todas as amostras de carcaça (N = 97).

⁶ Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das amostras positivas para *E. coli* não patogênica (N = 24).

* Unidade formadora de colônia (UFC) em 100 cm² da superfície da carcaça.

Ocorrência de STEC, EPEC e Salmonella spp. nas fezes e superfície das carcaças

O critério usado para definir se uma amostra era positiva para STEC foi quando era positiva na qPCR para os genes *stx*₁ e/ou *stx*₂, enquanto que uma amostra foi considerada positiva para EPEC quando positiva para o gene *eae*. As ocorrências globais e ajustadas de STEC e EPEC na superfície das carcaças e nas fezes estão demonstradas na Figura 2.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos para a ocorrência de STEC nas fezes e superfície das carcaças de bovinos alimentados com diferentes níveis de concentração de WDG. Todas as amostras, tanto de carcaça quanto de fezes, foram negativas para *Salmonella* spp.

Análises físico-químicas das fezes

Os resultados da média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis físico-químicas avaliadas nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis WDG estão demonstrados na Tabela 7 e 8. Os tratamentos com 30 e 45% de WDG resultaram em níveis significativamente mais altos de FDN quando comparados com os tratamentos WDG 0 e 15% ($P < 0.05$). Quanto a PB, também foram observadas diferenças entre os tratamentos WDG 15 e 30% ($P = 0,0116$) (Tabela 3).

Quanto à média dos quadrados mínimos da concentração de AGV, as fezes dos animais do tratamento WDG 15% apresentaram concentração média de ácido propiônico (C_3) maior que as do tratamento WDG 45% ($P = 0,0283$). A concentração média de ácido butírico (C_4) foi maior nas fezes dos animais do tratamento WDG 15% quando comparada com as dos tratamentos WDG 30 e 45% ($P = 0,0048$). O tratamento WDG 0% apresentou maior concentração de C_4 do que o tratamento WDG 45% ($P = 0,0048$) (Tabela 4).

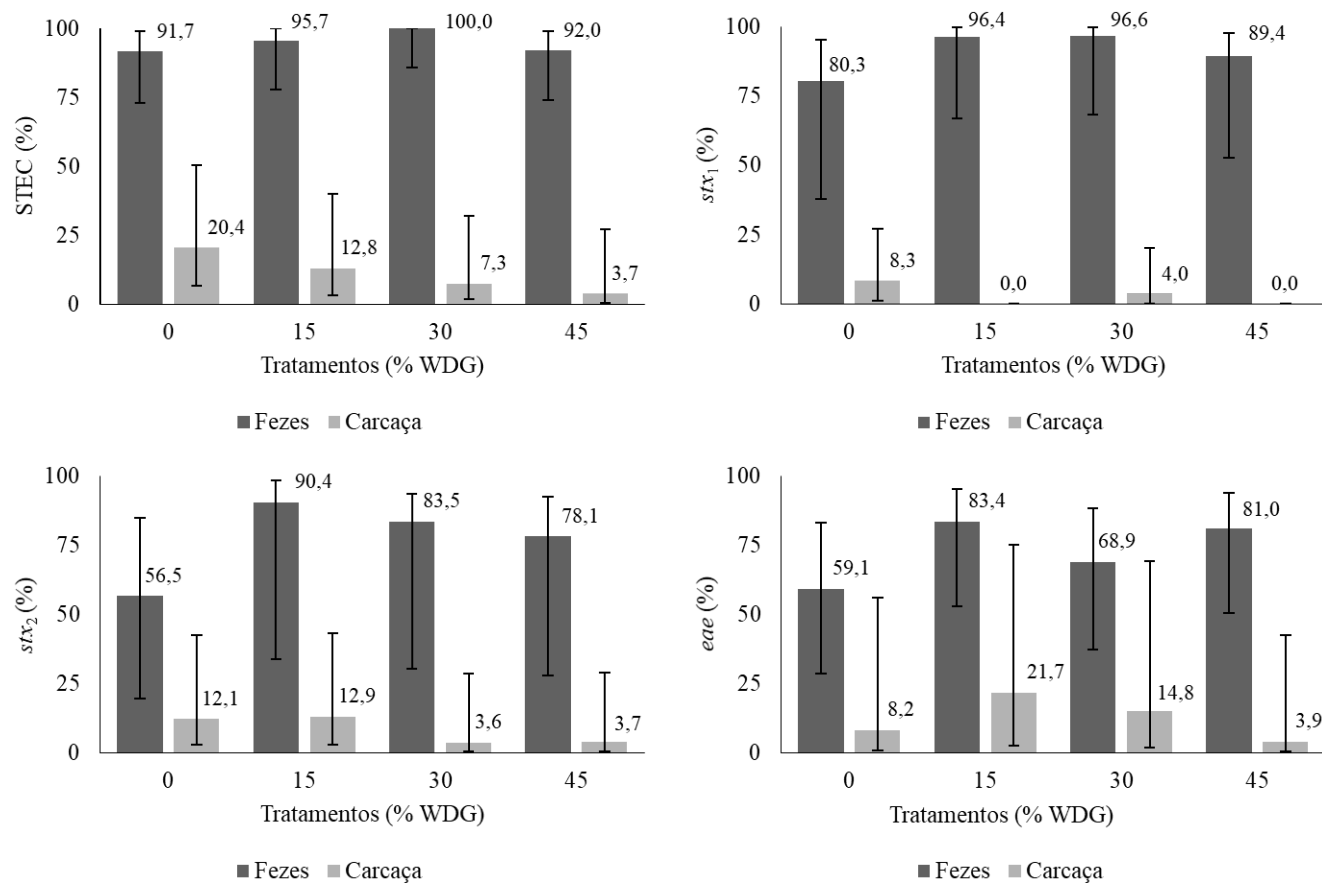


Figura 2 - Ocorrência e IC 95% de STEC (*stx1* e/ou *stx2*) e EPEC (*eae*) nas fezes e superfície das carcaças de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

Tabela 3 - Média dos quadrados mínimos e erro padrão médio das variáveis físico-químicas avaliadas nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG)

	Tratamentos (% WDG) ¹				EPM ²	Valor <i>P</i>
	0	15	30	45		
Matéria seca (%)	0,19	0,19	0,19	0,18	0,01	0,7218
FDN ³ (% MS)	45,87 ^a	46,44 ^a	52,57 ^{b*}	54,27 ^{b*}	1,29	0,0006
FDA ⁴ (% MS)	42,23	38,10	41,04	39,83	1,25	0,1536
Proteína bruta (% MS)	13,33 ^{ab}	12,99 ^a	14,06 ^{b*}	13,56 ^{ab}	0,22	0,0116
Extrato etéreo (% MS)	1,87	1,83	2,14	1,91	0,10	0,1159
pH	6,30	6,26	6,16	6,23	0,06	0,2114
Ácido láctico						
mg/g MN ⁵	0,11	0,11	0,09	0,10	0,01	0,7506
mg/g MS ⁶	0,60	0,57	0,49	0,59	0,07	0,6982

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Erro padrão médio.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro.

⁴ Fibra insolúvel em detergente ácido.

⁵ Concentração em mg/g da matéria natural.

⁶ Concentração em mg/g da matéria seca.

a, b, c, d Valores com letras distintas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.

Tabela 4 - Média dos quadrados mínimos e IC 95% da concentração de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem inoculada de grãos úmidos de destilaria desengordurados (WDG).

	Tratamentos (% WDG) ¹				Valor <i>P</i>
	0	15	30	45	
AGV (mg/g MN)²					
Acético (C ₂)					0,2354
Média	33,00	36,87	26,04	23,61	
IC 95%	(22,88-44,92)	(26,19-49,31)	(17,31-36,47)	(15,29-33,65)	
Propiônico (C ₃)					0,0283
Média	15,47 ^{ab}	16,66 ^a	10,87 ^{ab}	9,11 ^b	
IC 95%	(11,61-19,84)	(12,70-21,14)	(7,75-14,46)	(6,23-12,47)	
Butírico (C ₄)					0,0048
Média	8,43 ^{ab}	10,08 ^a	5,77 ^{bc}	4,70 ^{c*}	
IC 95%	(6,27-10,86)	(7,75-12,68)	(4,03-7,77)	(3,09-6,57)	
Isobutírico					0,8895
Média	0,59	0,60	0,53	0,53	
IC 95%	(0,42-0,76)	(0,44-0,77)	(0,38-0,70)	(0,37-0,69)	
Valérico (C ₅)					0,1231
Média	0,62	0,62	0,76	0,86	
IC 95%	(0,47-0,79)	(0,47-0,78)	(0,61-0,93)	(0,70-1,02)	
Isovalérico					0,6011
Média	0,46	0,61	0,53	0,51	
IC 95%	(0,31-0,62)	(0,45-0,77)	(0,39-0,68)	(0,36-0,66)	
AGV Total					0,0958
Média	58,70	65,73	45,12	39,63	
IC 95%	(42,72-77,16)	(48,87-85,03)	(31,59-61,00)	(26,87-54,80)	
Razão AGV (MN)³					
C ₂ /C ₃					0,0574
Média	2,18	2,28	2,23	2,75 [*]	
IC 95%	(1,87-2,51)	(1,97-2,61)	(1,92-2,55)	(2,41-3,10)	
C ₂ +C ₄ /C ₃					0,0876
Média	2,75	2,89	2,76	3,30	
IC 95%	(2,40-3,11)	(2,54-3,26)	(2,42-3,12)	(2,94-3,69)	

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Concentração média de ácidos graxos voláteis (AGV) em mg/g da matéria natural.

³ Razão entre os ácidos orgânicos voláteis (AGV) na matéria natural.

a, b, c, d Valores com letras disitintas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.

DISCUSSÃO

A principal hipótese desse estudo era que, quanto maior o nível de inclusão de WDG na dieta, maior seria a ocorrência de patógenos nas fezes e, conseqüentemente, na carcaça. No entanto, não houve diferença na ocorrência desses patógenos nas fezes e na carcaça de bovinos submetidos a dietas contendo 0, 15, 30 e 45% de WDG (Tabelas 3, 4 e Figura 2). Esses resultados não concordam com a maioria dos estudos, os quais demonstraram que a inclusão de DG na dieta contribui para o aumento da ocorrência de enterobactérias patogênicas nas fezes de bovinos (Chaney et al., 2018; Fink et al., 2018. Schneider et al., 2018).

Porém, não há um consenso científico sobre a partir de que nível de inclusão o DG pode influenciar no aumento da prevalência de patógenos nas fezes de bovinos. Jacob et al. (2010), ao avaliarem 3350 amostras de fezes, verificaram que não houve diferença na ocorrência de *E. coli* O157:H7 entre os grupos controle (sem adição de DG) e grupo recebendo 20% de DG ($P = 0,4$), todavia, bovinos que receberam dietas com 40% do coproduto apresentaram maior ocorrência do que os animais dos grupos controle e dos que receberam 20% de DG ($P = 0,02$ e $P = 0,05$, respectivamente).

Os estudos supracitados sugerem que mudanças no ambiente pós-rúmen, sobretudo no intestino grosso e junção reto anal, em consequência do aumento na concentração de proteínas e diminuição na concentração de amido no coproduto, resultam em menor taxa fermentativa, aumento do pH e diminuição nas concentrações de AGV, o que cria ambiente favorável para a colonização e multiplicação de enterobactérias patogênicas nesses locais (Paddock et al., 2013; Chaney et al., 2018).

Os principais limitantes da colonização e multiplicação de STEC e *Salmonella*

spp. no TGI de bovinos são o baixo pH, alta concentração de AGV e de outros compostos inibitórios produzidos pelos micro-organismos ruminais e a competição de nutrientes por bactérias comensais. Mesmo diante dessas situações, a STEC é capaz de sobreviver no ambiente ruminal (Paddock et al., 2013; Segura et al., 2018).

No presente estudo, os bovinos do tratamento WDG 0% foram alimentados com dieta padrão dos confinamentos brasileiros (Oliveira e Millen, 2014; Pinto e Millen, 2016), o que resultou em alta ingestão de amido e conseqüentemente maior excreção nas fezes. Não foi observada diferença na excreção de amido entre os tratamentos 0 e 15% de WDG (Tabela 4).

A concentração de ácido propiônico no presente estudo foi maior nas fezes dos animais do tratamento 15% de WDG dos que nas fezes dos animais do tratamento com 45% de WDG ($P = 0,02$). A maior inclusão de amido, que é um carboidrato não fibroso altamente fermentável, estimula a rota metabólica do ácido propiônico via lactato e desfavorece a rota do succinato, o que resulta em maior produção de ácido láctico e expressiva redução do pH.

O WDG apresenta maior concentração de proteína e FDN, em relação ao milho moído (NRC, 2016). Portanto, como esperado, a concentração de FDN foi significativamente maior nas fezes dos animais dos tratamentos contendo 30 e 45% de WDG do que nas fezes dos animais do tratamento com 0 e 15% de WDG ($P = 0,0006$), que não diferiram entre si ($P = 0,05$). A concentração de PB foi significativamente maior nas fezes dos bovinos do tratamento com 30% de WDG do que no tratamento com 15% de WDG ($P = 0,01$). Embora, fosse esperada maior concentração de PB no tratamento com 45% de WDG, esse não diferiu dos outros tratamentos (Tabela 2).

A hipótese de que a baixa concentração de amido no DG gera menor

fermentação pós-rúmen, aumento do pH e redução na concentração de AGV e, conseqüentemente maior ocorrência de patógenos (Paddock et al., 2013; Chaney et al., 2018), não se aplica aos achados do presente estudo, que embora não tenha encontrado diferença descritiva na ocorrência de STEC nas fezes, observou-se que quanto maior o nível de WDG, menor a ocorrência nas carcaças, sendo que as ocorrências nas carcaças dos tratamentos 0, 15, 30 e 45% de WDG foi de 20,4, 12,8, 7,3 e 3,7%, respectivamente (Tabela 4 e Figura 2). Ou seja, os resultados do presente estudo são completamente contrários aos reportados até o momento (Paddock et al., 2013; Chaney et al., 2018).

As principais suposições para os resultados encontrados nesse estudo são: 1) Uma vez que todas as dietas são caracterizadas por apresentarem alta energia, todos os tratamentos proporcionaram alta taxa fermentativa, porém em locais diferentes, portanto a ocorrência elevada de STEC nas fezes pode ser resultado da seleção de cepas ácido-resistentes; 2) A utilização de inoculante bacteriano na silagem de WDG e a possível presença de contaminantes no coproduto, tais como resíduos de antibióticos e micotoxinas, podem ter inibido o crescimento de STEC após ingestão pelos animais, o que explicaria a menor ocorrência do patógeno na carcaça dos bovinos submetidos a dietas com inclusão do coproduto.

Acredita-se que devido a maior quantidade de milho na dieta nos tratamentos 0 e 15 de WDG e, conseqüentemente, maior concentração de amido e proteína digerível no rúmen (PDR), os animais desses tratamentos deveriam apresentar alta taxa fermentativa no rúmen, o que favoreceria a sincronização ruminal e maior produção de AGV nesse local e que ainda, devido à alta produção de AGV no rúmen, uma quantidade passaria para ser absorvida pós-rúmen, assim como parte do amido e da PDR também poderia ter passado para ser fermentada pós-rúmen.

Na produção de etanol de milho, o amido é fermentado em etanol, restando fibra, proteína e gordura. O teor de proteína é concentrado, passando de 10% no milho para 30% no coproduto (Ahern et al., 2016). A porção proteica consiste basicamente de zeína, proteína derivada do endosperma do grão de milho (Liu, 2012). O grão de milho produzido no Brasil possui mais zeína do que o grão dos EUA. Essa proteína está associada com a “vitreosidade” e com a textura do grão. Portanto, os grãos brasileiros são mais “vitreos” e duros do que os grãos americanos, o que confere menor degradação proteica no rúmen (Dicostanzo e Wrigh, 2012; Lino, 2014; Lee et al., 2016). Portanto, supõe que os tratamentos com 30 e 45% de WDG proporcionaram maior ingestão de proteína não degradável no rúmen (PNDR) e FDN, o que resultou em maior fermentação pós-rúmen.

O pH médio das fezes dos bovinos de todos os tratamentos do presente estudo foi de 6,23 e a concentração média de AGV totais foi de 52,3 mg/g MN (Tabela 10 e 11). Essas condições deveriam criar um ambiente hostil para o crescimento de enterobactérias (Kanjee e Houry, 2013; Segura et al., 2018).

Normalmente, as enterobactérias crescem melhor em condições de pH neutro. Durante a passagem pelo TGI, essas precisam sobreviver ao estômago extremamente ácido, onde o pH varia de 1,5 a 3,0 e atua como importante barreira contra infecções (Kanjee e Houry, 2013). Após passar pelo estômago, essas enterobactérias passam para os intestinos delgado e grosso, os quais de forma geral apresentam pH neutro ou básico (Kanjee e Houry, 2013). Porém, em bovinos, dependendo da dieta, podem ocorrer altos níveis de fermentação pós-rúmen e, conseqüentemente, a produção de AGV e outros compostos, de modo que essas enterobactérias irão passar novamente por estresse ácido nesses locais (Wheeler e Noller, 1977; Parish, 2017).

O uso de inoculantes bacterianos tem apresentado efeitos positivos, que incluem a otimização da etapa de fermentação do processo de ensilagem, aumento da concentração de MS e nutrientes e estabilidade aeróbica da silagem (Queiroz et al., 2018). Normalmente, esses inoculantes possuem em sua composição, espécies homofermentativas, como o *L. plantarum*, usada pela sua capacidade de fermentar carboidratos solúveis em água, alta produção de ácido lático e rápida redução de pH. Outra espécie é a *L. buchneri*, um lactobacilo heterofermentativo que produz altas concentrações de ácido acético na silagem, o que inibe fungos, melhorando assim a estabilidade aeróbia da silagem (Bolsen et al., 1996; Gollop et al., 2004).

Além desses efeitos, alguns probióticos demonstraram ação antimicrobiana, como a produção de bactericidas e ácidos graxos com potencial de inibir o crescimento de patógenos na silagem e, assim, impedir a disseminação de patógenos no rebanho (Ogunade et al., 2016; Ogunade et al., 2017; Srisesharam et al., 2018).

Devido à forma diferenciada do uso de DG nos confinamentos do Brasil, os autores do presente estudo sugerem que bovinos alimentados com silagem de WDG com inoculantes bacterianos podem apresentar menor ocorrência de patógenos nas fezes e carcaça. Outra hipótese para os resultados encontrados nesse estudo, com base principalmente nos resultados de ocorrência de STEC observados na carcaça (Figura 2), é que a presença de resíduos de antibióticos e outros contaminantes no WDG possa ter contribuído para menor ocorrência nas carcaças dos animais submetidos aos tratamentos com maior concentração do coproduto (Lee et al., 2016).

Diante disso, antibióticos como virginamicina, tetraciclina, eritromicina e penicilina têm sido utilizados para controlar essa proliferação bacteriana durante a

etapa de fermentação na produção de etanol. Entretanto, existe a preocupação com o aumento da resistência bacteriana a esses antimicrobianos, além do risco de resíduos desses antibióticos no DDGS (Compart et al., 2013; Bischof et al., 2016). Assim, a presença de resíduos de antibióticos no WDG também pode atuar como inibidor de crescimento para enterobactérias (Akhtar et al., 2016; Adamu et al., 2018).

Embora no presente estudo não tenha sido encontrada diferença significativa na ocorrência de STEC nas fezes entre os tratamentos, foi observada alta ocorrência de STEC nas fezes, média de 94,3%, sendo mais alta do que a reportada em estudos anteriores, os quais demonstraram ocorrência de 0,5 a 41,4% (Paquette et al., 2018; Parvej et al., 2018). Quanto a pesquisa de STEC na carcaça de bovinos, estudo reportaram ocorrência média de 4,6 % (Fontcuberta et al., 2018; Stromberg et al., 2018), enquanto que no presente estudo a ocorrência média foi de 11,05% (Figura 2).

Esses resultados são alarmantes, pois a alta ocorrência de patógenos em animais de criação constitui em aumento do risco para humanos (Soller et al., 2015; Um et al., 2016; Karmali et al., 2016). Em 2010, a *European Food Safety Authority* (EFSA), ao realizar uma avaliação quantitativa de riscos microbianos (QMRA), demonstrou que a redução na ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos resulta em uma diminuição correspondente na ocorrência do patógeno em humanos. No presente estudo todas as amostras de fezes foram negativas para *Salmonella* spp. Esses resultados podem ser devido à predileção e capacidade dessa enterobactéria de invadir linfonodos periféricos, que têm sido considerados uma das principais fontes de contaminação de *Salmonella* spp. para a carcaça e carne bovina (Li et al., 2015; Webb et al., 2017; Vohra et al., 2018). Além disso, a metodologia de qPCR

para pesquisa de *Salmonella* spp. utilizada nesse estudo apresentou pouca sensibilidade analítica, <100 cópias/ μ L. Estudos anteriores reportaram que a ocorrência de *Salmonella* spp. nas fezes de bovinos variou de 0,5 a 11,5% (Schmidt et al., 2014; Barlow et al., 2015; Xie et al., 2016).

CONCLUSÃO

O aumento nos níveis de inclusão de silagem de WDG na dieta de bovinos machos não castrados, 50% Angus e 50% Nelore, confinados não aumentou a ocorrência e quantificação de indicadores higiênicos e sanitários na carcaça, bem como a ocorrência de patógenos nas fezes e superfície das carcaças. Embora não tenha sido encontrada diferença significativa na ocorrência de STEC entre os tratamentos, foi observada alta ocorrência desse patógeno nas fezes e nas carcaças em todos os tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ADAMU, M.S.; UGOCHUKWU, I.C.I.; IDOKO, S.I. et al. Virulent gene profile and antibiotic susceptibility pattern of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from cattle and camels in Maiduguri, North-Eastern Nigeria. **Tropical animal health and production**, p. 1-15, 2018.
- AGGA, G.E.; ARTHUR, T.M.; HINKLEY, S. et al. Evaluation of rectoanal mucosal swab sampling for molecular detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in beef cattle. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 4, p. 661-667, 2017.
- AGGA, G.E.; ARTHUR, T.M.; SCHMIDT, J.W. et al. Diagnostic accuracy of rectoanal mucosal swab of feedlot cattle for detection and enumeration of *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 4, p. 531-537, 2016.
- AHERN, N.A.; NUTTELMAN, B.L.; KLOPFENSTEIN, T.J. et al. Comparison of wet and dry distillers grains plus solubles to corn as an energy source in forage-based diets. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, p.758–767, 2016.
- AKHTAR, M.; MASERATI, A.; DIEZ-GONZALEZ, F. et al. Does antibiotic resistance influence shiga-toxigenic *Escherichia coli* O26 and O103 survival to stress environments?. **Food Control**, v. 68, p. 330-336, 2016.
- ALEXANDER, T.W.; BOOKER, C.W.; GOW, S.P. et al. Recovery of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* after storage of bovine feces in Cary-Blair medium.

Canadian Journal of Microbiology, v. 55, n. 10, p. 1224-1227, 2009.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 15 ed. Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 1990.

ARTHUR, T.M.; KALCHAYANAND, N.; AGGA, G.E. et al. Evaluation of bacteriophage application to cattle in lairage at beef processing plants to reduce *Escherichia coli* O157: H7 prevalence on hides and carcasses. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 1, p. 17-22, 2017.

BARLOW, R.S.; MCMILLAN, K.E.; DUFFY, L.L. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* and *Escherichia coli* from Australian cattle populations at slaughter. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 5, p. 912-920, 2015.

BISCHOFF, K.M.; ZHANG, Y.; RICH, J.O. Fate of virginiamycin through the fuel ethanol production process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 5, p. 76, 2016.

BOLSEN, K.K.; ASHBELL, G.; WEINBERG, Z.G. Silage fermentation and silage additives-Review. Asian-Australasian **Journal of Animal Sciences**, v. 9, n. 5, p. 483-494, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018.

Disponível em: <

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> >. Acesso em: 06 mar. 2018.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; LONERAGAN, G.H. et al. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ecology in cattle and management based options for reducing fecal shedding. Agriculture. **Food and Analytical Bacteriology Journal**, v. 3, p. 39-69, 2013.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. Métodos de Análises de Alimentos. **FEALQ**, 2004.

CHANEY, W.E.; MALONEY, R.; JOHNSON, B.J. et al. Corn-Based Distillers' Grains in Diets for Feedlot Cattle are Associated with the Burden of *Escherichia coli* O157 in Feces. **Foodborne pathogens and disease**, 2018.

COMPART, D.P.; CARLSON, A.M.; CRAWFORD, G.I. et al. Presence and biological activity of antibiotics used in fuel ethanol and corn co-product production. **Journal of animal science**, v. 91, n. 5, p. 2395-2404, 2013.

COSTA, M. Mais por menos Subproduto do etanol de milho estimula ganho de peso com menor consumo de ração, 2016. Disponível em:

<<http://www.portaldbo.com.br/Revista-DBO/Noticias/Mais-por-menos/16137>>.

Acesso em: 10 nov. 2017.

CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems**, p.185-214, 2015.

DICOSTANZO, A.; WRIGH, C.L. Feeding Ethanol Coproducts to Beef Cattle. In: Distillers Grains Production, Properties, and Utilization. Boca Raton: Flórida, 2012. Chap. 12, p. 243-246.

- EDRINGTON, T.S.; LONERAGAN, G.H.; HILL, J. et al. Development of a transdermal *Salmonella* challenge model in calves. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 7, p. 1255-1258, 2013.
- FINK, R.C.; POPOWSKI, J.M.; ANDERSON, J.E. et al. Impact of distillers grain solids (DGS) and seasonality on the prevalence of *Escherichia coli* O157 at an abattoir in the US Upper Midwest. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 237-241, 2018.
- FONTCUBERTA, M.; PLANELL, R.; TORRENTS, A. et al. Characterization of Shiga Toxin - Producing *Escherichia coli* O157 Isolates from Bovine Carcasses. **Journal of food protection**, v. 79, n. 8, p. 1418-1423, 2016.
- GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. Uma avaliação de protocolos de purificação de DNA baseados em chelex para a tipagem de bactérias do ácido láctico. **Journal of Microbiological Methods**, v. 42, n.2, p.175-184, 2000.
- GOLLOP, N.; ZAKIN, V.; WEINBERG, Z.G. Antibacterial activity of lactic acid bacteria included in inoculants for silage and in silages treated with these inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 3, p. 662-666, 2005.
- IGLESIAS, M.A.; KRONING, I.S.; DECOL, L.T. et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, v. 100, p. 96 - 101, 2017.
- ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. (ISO) 17604:2015 (E). Microbiology of the food chain - Carcass sampling for microbiological analysis. Switzerland, 2015. 13 p.
- JACOB, M.E.; PADDOCK, Z.D.; RENTER, D. G. et al. Inclusion of dried or wet distillers' grains at different levels in diets of feedlot cattle affects fecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7238-7242, 2010.
- KANJEE, U.; HOURY, W.A. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. **Annual review of microbiology**, v. 67, p. 65-81, 2013.
- KARMALI, M.A. Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 3, p. 371-376, 2016.
- LIEW, W.P.; MOHD-REDZWAN, S. Mycotoxin: its impact on gut health and microbiota. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 60, 2018.
- LINO, F.A. Características Físicas, Químicas e Degradação Ruminal de Grãos de Milho. 2014. 37f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária E Zootecnia, Goiás.
- LIU, K. Chemical Composition of DDGS. In: Distillers Grains Production, Properties, and Utilization. Boca Raton: Florida, 2012. Chap. 8, p. 145-175.
- MCKIEARNAN, A.; CERNICCHIARO, N.; SANDERSON, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on cattle hides and bacterial transfer from hides to carcasses in Midwestern commercial beef slaughter operations. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 287-287, 2016.
- MCMANUS, C.; BARCELLOS, J.O.J.; FORMENTON, B.K. et al. Dynamics of cattle

production in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. 1 - 15, 2016.

MUGHINI-GRAS, L.; ENSERINK, R.; FRIESEMA, I. et al. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014.

MUGHINI-GRAS, L.; PELT, W.; VOORT, M. et al. Attribution of human infections with Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) to livestock sources and identification of source specific risk factors, The Netherlands (2010–2014). **Zoonoses and Public Health**, v. 65, n. 1, 2018.

OGUNADE, I.M.; JIANG, Y.; KIM, D.H. et al. Fate of *Escherichia coli* O157: H7 and bacterial diversity in corn silage contaminated with the pathogen and treated with chemical or microbial additives. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 3, p. 1780-1794, 2017.

OGUNADE, I.M.; KIM, D.H.; JIANG, Y. et al. Control of *Escherichia coli* O157: H7 in contaminated alfalfa silage: Effects of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4427-4436, 2016.

OLIVEIRA, C.A; MILLEN, D.D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, 64 - 75, 2014.

PAQUETTE, S.J.; STANFORD, K.; THOMAS, J.E. et al. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, *Escherichia coli* O178 and O157 in feces of western-Canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. 1-13, 2018.

PARVEJ, M.S.; MAMUN, M.; HASSAN, J. et al. Prevalence and characteristics of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from beef slaughterhouse. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 5, n. 2, p. 218-225, 2018.

PINTO, A.C.J.; MILLEN, D.D. Situação atual da engorda de bovinos em confinamento e modelos nutricionais em uso. In: Sebastião de Campos Valadares Filho et al. (Org.). **Simpósio de Produção de Gado de Corte (X Simcorte)**. 1 ed. Viçosa/MG:UFV, v.1, p.103-120, 2016.

QUEIROZ, O.C.M.; OGUNADE, I.M.; WEINBERG, Z. et al. Silage review: Foodborne pathogens in silage and their mitigation by silage additives. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4132-4142, 2018.

SAMUELSON, K.L.; HUBBERT, M.E.; GALYEAN, M.L. et al. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2015 New Mexico state and Texas Tech university survey. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 2648 – 2663, 2016.

SCHMIDT, J.W.; AGGA, G.E.; BOSILEVAC, J.M. et al. Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the beef cattle production and processing continuum. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 03079-14, 2014.

SCHNEIDER, L.G.; KLOPFENSTEIN, T.J.; STROMBERG, Z.R. et al. randomized controlled trial to evaluate the effects of dietary fibre from distillers grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* detection from the rectoanal mucosa and hides of

- feedlot steers. **Zoonoses and public health**, v. 65, n. 1, p. 124-133, 2018.
- SEGURA, A.; AUFFRET, P.; BIBBAL, D. et al. E. Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157: H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 375, 2018.
- SILVA, J. R.; NETTO, D. P.; SCUSSEL, V. Maria. Grãos secos de destilaria com solúveis, aplicação em alimentos e segurança: uma revisão. **Pubvet**, v. 10, p. 190-270, 2016.
- SOLLER, J.; BARTRAND, T.; RAVENSCROFT, J. et al. Estimated human health risks from recreational exposures to stormwater runoff containing animal faecal material. **Environmental modelling & software**, v. 72, p. 21-32, 2015.
- SRISESHARAM, S.; PARK, H.S.; SOUNDHARRAJAN, I. et al. Evaluation of probiotic *Lactobacillus plantarum* against foodborne pathogens and its fermentation potential in improving *Lolium multiflorum* silage quality. **3 Biotech**, v. 8, n. 10, p. 443, 2018.
- STROMBERG, Z.R.; REDWEIK, G.A.J; MELLATA, M. Detection, prevalence, and pathogenicity of Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* from cattle hides and carcasses. **Foodborne pathogens and disease**, v. 15, n. 3, p. 119-131, 2018.
- UM, M.M.; BARRAUD, O.; KÉROURÉDAN, M. et al. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. **Water research**, v. 88, p. 30-38, 2016.
- USDA. United States Department of Agriculture. Overview of the United States Cattle Industry, 2016. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/USCatSup/USCatSup-06-24-2016.pdf>>. acesso em: 5 mar. 2018.
- VENEGAS-VARGAS, C.; HENDERSON, S.; KHARE, A. et al. Factors associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* shedding by dairy and beef cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 16, p. 5049-5056, 2016.
- VOHRA, P.; BUGAREL, M.; TURNER, F. et al. Quantifying the survival of multiple *Salmonella enterica* serovars in vivo via massively parallel whole-genome sequencing to predict zoonotic risk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. e02262-17, 2018.
- WEBB, H.E.; BRICHTA-HARHAY, M.; BRASHEARS, M.M. et al. *Salmonella* in Peripheral Lymph Nodes of Healthy Cattle at Slaughter. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2017.
- WHEELER, T. L.; KALCHAYANAND, Norasak; BOSILEVAC, Joseph M. Pre-and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the US beef industry. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 372-382, 2014.
- WHEELER, W.E.; NOLLER, C.H. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 131-135, 1977.
- XIE, Y.; SAVELL, J.W.; ARNOLD, A.N.; et al. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* and *Salmonella bacteriophages* recovered from beef cattle feedlots in south Texas. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 8, p. 1332-1340, 2016.

ANEXO

Anexo 1

FERREIRA, M. S.; NIEHUES, M. B.; TOMAZ, L. A.; FOGACA, L. A.; PAULINO, P. V. R.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B.; MACHADO NETO, O. R. Levels of wet distillers grains for F1 Angus-Nellore bulls finished in feedlot : dry matter intake and performance. In: **The 10th International Symposium on the Nutrition of Herbivores**, 2018, Clermont Ferrand. Proceedings of the 10th International Symposium on the Nutrition of Herbivores ISNH 2018. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. v. 9. p. 549-549.

NIEHUES, M. B.; FERREIRA, M. S.; TOMAZ, L. A.; FOGACA, L. A.; PAULINO, P.V.R.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B.; MACHADO NETO, O.R. Feeding behaviour of F1 Angus-Nellore cattle fed different levels of wet distillers grains. In: **The International Symposium on the Nutrition of Herbivores**, 2018, Clermont Ferrand. Proceedings of the 10th International Symposium on the Nutrition of Herbivores ISNH 2018. Cambridge: Cambridge University Press, 2018. v. 9. p. 563-563.

Levels of wet distillers grains for F1 Angus-Nellore bulls finished in feedlot: dry matter intake and performance

Mateus S. Ferreira¹, Maria Betânia Niehues², Lais A. Tomaz², Luiz Antonio Fogaça², Pedro V. R. Paulino³, Cyntia L. Martins², Mário Arrigoni², Otávio R. Machado Neto^{1,2}

¹São Paulo State University, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil, ²São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil, ³Cargill Animal Nutrition, Campinas, São Paulo, Brazil

E-mail: otaviomachado@fmvz.unesp.br

Take home message Wet distillers grains may partially replace corn in beef cattle diets.

Introduction The use of corn for ethanol production has increased in Brazil, enabling the use of wet distillers grains (WDG) in animal nutrition. There is no research on the use of WDG in diets for F1 Angus-Nellore bulls. In Brazil, this is a growing genetic group which often receives diets with high starch content and it may cause ruminal acidosis. Research with Angus-Nellore cattle is still necessary once this group is more susceptible to ruminal acidosis than purebred Angus animals. Furthermore, there is little information about de-oiled WDG, which was used in the present study. The use of WDG may be advantageous since they present high digestibility fibre. Therefore, the aim was to evaluate the effect of different levels of WDG on the dry matter intake (DMI) and performance of feedlot cattle.

Materials & methods A hundred F1 Angus-Nellore bulls with initial average body weight of 369 ± 48 kg and average age of 24 months were allocated in a completely randomized blocks design in group pens with 5 animals in each, with five pens per treatment where they were fed for 129 days. The WDG used in this study contained 320 g of CP/kg DM and 43 g of ether extract/kg DM. The diets presented: 148.4, 161.7, 191.0 and 220.0 g of CP/kg DM; 627.6, 540.4, 434.3 and 328.3 of non-fibre carbohydrates (g/kg DM); and 162.3, 234.6, 308.3 and 382.1 of NDF g/kg DM, according to the increasing levels of WDG (0, 150, 300 and 450 g/kg DM, Table 1). Statistical analyses were performed through SAS statistical software, using the Mixed procedure with linear, quadratic and 0 vs. WDG contrasts.

Table 1 Composition of experimental diets with different levels of distillers grains.

Ingredients (g/kg of DM)	0	150	300	450
Sugarcane bagasse	71.6	71.1	71.1	71.1
Tifton-85 hay	42.0	42.0	42.0	42.0
Ground corn	748.9	652.7	520.0	387.3
Soybean meal	103.3	47.7	29.3	10.9
Wet distillers grains (WDG)	-	150	300	450
Potassium chloride	-	2.30	3.40	4.50
Mineral-vitaminic supplement	34.2	34.2	34.2	34.2

Results DMI increased with the inclusion of WDG when compared to the control treatment, and it can be due a lower subacute acidosis probability. The replacement of corn by WDG tended to increase ADG ($P = 0.06$). When converted to ketone bodies, the excess protein in WDG diets is used as energy source which may have contributed to the ADG in these diets (Klopfenstein *et al.*, 2008). Animals fed WDG had higher slaughter weight (Table 2). The cost of 129 days on feed was US\$ 278.8; 273.8; 257.6 and 241.4 per head according to the increasing levels of WDG. Despite its low fat content, de-oiled WDG can increase the profitability of feedlot operations when used to replace corn in high energy diets.

Table 2 Performance of F1 Angus-Nellore bulls fed different WDG levels.

Item	WDG levels (g/kg of DM)				EPM	Effects		
	0	150	300	450		Linear	Quadratic	0 vs WDG
Initial body weight (kg)	369	370	370	369	22.9	0.94	0.65	0.82
Dry matter intake (kg/d)	10.74	11.53	11.44	11.35	0.332	0.13	0.09	*
Average daily gain (kg/d)	1.80	1.91	2.01	1.90	0.090	0.11	0.10	0.06
F. Efficiency (kg ADG/kg DMI)	0.169	0.165	0.176	0.170	0.010	0.56	0.86	0.85
Slaughter weight (kg)	601	616	630	615	18.8	0.11	0.06	*

Conclusion High inclusion of WDG does not impair the performance and increases dry matter intake.

Acknowledgements This research was supported by grants from FAPESP, São Paulo, Brazil.

References

Klopfenstein TJ, Erickson GE and Bremer VR 2008. Journal of Animal Science 86, 1223-1231.

Feeding behaviour of F1 Angus-Nellore cattle fed different levels of wet distillers grains

Maria Betânia Niehues¹, Mateus S. Ferreira², Lais A. Tomaz¹, Luiz Antônio Fogaça¹, Pedro V.R. Paulino³, Cyntia L. Martins¹, Mário Arrigoni¹, Otávio R. Machado Neto^{1,2}

¹São Paulo State University, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, São Paulo, Brazil, ²São Paulo State University, School of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, São Paulo, Brazil, ³Cargill Animal Nutrition, Campinas, São Paulo, Brazil

E-mail: otaviomachado@fmvz.unesp.br

Take home message High levels of wet distillers grains raise daily time spent eating, number and size of meals.

Introduction Several factors are related to the regulation of dry matter intake in ruminants. High concentrations of starch and energy in the diet can generate differences in dry matter intake. A higher proportion of rumen degradable starch is associated with an increase in organic acids production and considerable reduction in acetate/propionate ratio. These factors may affect the feeding behaviour of cattle in feedlots. Little is known about how the inclusion of wet distillers grains, a high fibre and protein by-product, influences feeding behaviour (Swanson *et al.*, 2014). Therefore, the aim was to evaluate the replacement of corn and soybean meal by increasing levels of WDG on the feed behaviour of Angus-Nellore cattle.

Material & methods One hundred F1 Angus-Nellore bulls with initial average body weight of 369 ± 48 kg and average age of 24 months were allocated in a completely randomized block design in group pens with 5 animals in each, with five pens per treatment where they were fed for 129 days. The WDG contained 320 g of CP/kg DM, 578 g NDF/kg DM and 43 g of ether extract/kg DM. The diets presented: 148, 161, 191 and 220 g of CP/kg DM; 627, 540, 434 and 328 of non-fibre carbohydrates (g/kg DM); and 162, 234, 308 and 382 of NDF g/kg DM, according to the level of WDG (0, 150, 300 and 450 g/kg DM). The content of NDF-roughage was 90 g/kg DM in all treatments. Diets were provided twice a day and daily intake was obtained by weighing the offered diet and leftovers. Every five minutes, during three periods of 24 hours, animals were assessed for feeding behaviour. The observations were performed at the 7th (D-7), 52th (D-52) and 93rd (D-93) days of the experiment, according to Robles *et al.* (2007). Time spent eating (EAT), ruminating (RUM), resting (minutes) and number of meals per day were assessed. DMI for each pen was measured at the collection day. Meal length (minutes) was calculated by dividing EAT by the number of meals/day. Dry matter intake per meal (kg) was calculated by dividing DMI by the average number of meals per pen in each day. EAT and RUM data were used to calculate the time needed to eat one kg DM (MINDM; EAT/DMI) and rumination rate (DMRR; RUM/DMI) expressed in minutes per kg of DM. Data were analysed as repeated measures using the MIXED procedure of SAS with linear, quadratic and 0 vs. WDG contrasts and are presented in Table 1

Results & discussion There was a linear effect on EAT with the inclusion of WDG, which can be an effect of changes in dietary carbohydrate source and, consequently, in the ruminal environment. Fermented corn starch in the rumen generates propionate and WDG fibre generates acetate. The lower DMI in the diet without WDG is probably due to a higher propionate production in the rumen, since propionate has greater hypophagic effect than acetate. After a meal, the increased portal flux of propionate and uptake by liver increase hepatic oxidative reactions which induce satiety resulting in smaller meals. RUM and DMRR were not affected by the treatments, probably because the diets presented the same content of roughage NDF. The effect of WDG on MINDM is a consequence of changes in the numbers of meals and dry matter intake per meal.

Table 1 Feeding behaviour of F1 Angus-Nellore bulls fed different levels of wet distillers grains.

	WDG levels (g/kg DM)				EPM	Effects		
	0	150	300	450		Linear	Quadratic	0 vs. WDG
EAT (min/d)	158	159	175	194	7.18	***	0.22	0.03
RUM (min/d)	258	261	259	256	11.98	0.97	0.95	0.89
Resting (min/d)	1019	1014	1001	984	14.46	0.07	0.69	0.25
Meals (day)	13.8	12.7	14.2	16.1	0.88	*	0.10	0.58
DMI (kg/day)	11.02	11.83	11.21	11.74	0.32	0.15	0.55	*
Meal length (min)	12.2	13.7	13.0	12.2	0.89	0.85	0.18	0.43
DMI per meal (kg)	0.782	0.955	0.845	0.769	0.06	0.59	0.05	0.31
MINDM (min/kg DM)	14.7	13.9	16.2	17.1	0.74	***	0.23	0.23
DMRR (min/kg DM)	23.7	22.8	23.6	22.5	1.26	0.53	0.91	0.53

Conclusion Different levels of WDG grains change the eating behaviour of F1 Angus-Nellore bulls.

Acknowledgements This research was supported by grants from FAPESP, São Paulo, Brazil.

References

- Robles V, González LA, Ferret A, Manteca X and Calsamiglia S. 2007. *Journal of Animal Science* 85, 2538-2547
Swanson KC, Islas A, Carlson ZE, Goulart RS, Gilbery TC and Bauer ML. 2014. *Journal of Animal Science* 92, 2531-2537

Anexo 2

TABELA 13. Média dos quadrados mínimos e IC 95% de ácidos graxos voláteis (AGV) nas fezes de bovinos submetidos a dietas com diferentes níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG).

AGV (mg/g MS) ²	Tratamentos (% WDG) ¹				Valor <i>P</i>
	0%	15%	30%	45%	
Acético (C ₂)					0,2374
Média	177,67	200,81	139,51	130,99	
IC 95%	(124,38-240,37)	(144,32-266,56)	(94,21-193,59)	(86,68-184,33)	
Propiônico (C ₃) ³					0,0214
Média	83,32 ^{ab}	89,93 ^a	57,95 ^{ab}	50,34 ^b	
IC 95%	(62,93-106,52)	(68,96-113,66)	(41,83-76,65)	(35,13-68,22)	
Butírico (C ₄)					0,0083
Média	44,93 ^{ab}	54,36 ^a	30,64 ^b	25,99 ^{b*}	
IC 95%	(33,17-58,42)	(41,53-68,89)	(21,38-41,51)	(17,41-36,21)	
Isobutírico					0,9429
Média	3,01	3,06	2,72	2,86	
IC 95%	(2,17-3,94)	(2,23-3,98)	(1,96-3,57)	(2,07-3,74)	
Valérico (C ₅)					0,1293
Média	3,28	3,24	4	4,65	
IC 95%	(2,41-4,25)	(2,39-4,19)	(3,09-5,01)	(3,67-5,71)	
Isovalérico					0,5967
Média	2,36	4,18	2,76	2,73	
IC 95%	(1,70-3,10)	(3,36-5,07)	(2,09-3,48)	(2,05-3,47)	
AGV Total					0,1026
Média	316,68	357,06	242,35	220,12	
IC 95%	(232,20-414,18)	(268,24-458,52)	(171,67-325,14)	(152,52-300,01)	
Razão AGV (MS)⁴					0,0268
C ₂ /C ₃ ⁵	11,64 ^a	12,43 ^{ab}	11,79 ^a	15,21 ^{b*}	
Média	(9,96-13,44)	(10,72-14,25)	(10,16-13,54)	(13,33-17,20)	
IC 95%					0,0449
C ₂ +C ₄ /C ₃ ⁶	14,65	15,74	14,61	18,31 [*]	
	(12,71-16,72)	(13,76-17,85)	(12,73-16,61)	(16,18-20,56)	

¹ Níveis de concentração de silagem de grãos úmidos de destilaria (WDG) adicionados na dieta.

² Concentração média de ácidos graxos voláteis (AGV) em mg/g da matéria natural.

³ Razão entre os ácidos orgânicos voláteis (AGV) na matéria natural.

^{a, b, c, d} Valores com letras disíntas para o mesmo parâmetro são diferentes ($P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor diferente ($P < 0,05$) do grupo WDG 0%, considerando o teste de Dunnett.