

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

BRUNA PATRICIA DO COUTO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA CONTROLE DE *Salmonella* Enteritidis
BASEADO EM ESPECTROSCOPIA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL ASSOCIADA OU
NÃO A BIOMARCADORES LIGANTES

UBERLÂNDIA - MG

2024

BRUNA PATRICIA DO COUTO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA CONTROLE DE *Salmonella*
Enteritidis BASEADO EM ESPECTROSCOPIA E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL
ASSOCIADA OU NÃO A BIOMARCADORES LIGANTES

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor (a)
Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da
Silva

Coorientadora: Profa. Dra. Belchiolina
Beatriz Fonseca

UBERLÂNDIA - MG

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C871 2024	<p>Couto, Bruna Patricia do, 1992- Desenvolvimento de biossensor para controle de Salmonella Enteritidis baseado em espectroscopia e inteligência artificial associada ou não a biomarcadores ligantes [recurso eletrônico] : Alternativa de diagnóstico de Salmonella Enteritidis / Bruna Patricia do Couto. - 2024.</p> <p>Orientador: Robinson Sabino da Silva Silva. Coorientadora: Belchiolina Beatriz Fonseca Fonseca . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.210 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Silva, Robinson Sabino da Silva, 1981-, (Orient.). II. , Belchiolina Beatriz Fonseca Fonseca, 1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP
38400-902

Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado nº 161				
Data:	27/03/2024	Hora de início:	14h00 min	Hora de encerramento:	17 h 07 min
Matrícula do Discente:	11923IPA003				
Nome do Discente:	Bruna Patricia do Couto				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento de biossensor para controle de Salmonella Enteritidis baseado em espectroscopia e inteligência artificial associada ou não a biomarcadores ligantes				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia das doenças infecciosas e crônico-degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	bases celulares e moleculares da resposta imune em doenças infectoparasitárias e crônico-degenerativas em humanos e modelos experimentais				

Em 27 de março de 2024, às 14:00 horas, reuniu-se por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Presidente: Robinson Sabino da Silva - ICBIM/ UFU (orientador da candidata); Profa. Dra. Terezinha Knöbl - FMVZ - USP; Profa. Dra. Érica Crosara Ladir - IFTM; Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça - FAMEV - UFU; Dra. Luciana Machado Bastos - INCTTeraNano - UFU.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da

apresentação, o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO(A)

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a).

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva**,



Professor(a) do Magistério Superior, em 27/03/2024, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Érica Crosara Ladir de Lucca, Usuário Externo**, em 27/03/2024, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/03/2024, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Machado Bastos, Membro de Comissão**, em 28/03/2024, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Terezinha Knöbl, Usuário Externo**, em 28/03/2024, às 17:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5283648** e o código CRC **54996D00**.

Dedicatória

À Deus,

Porque Ele me deu saúde, força, determinação durante todo esse tempo.

Aos meus pais,

Sônia e Remaclo pelo total apoio que sempre me deram nessa minha jornada acadêmica. Por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões. Pelas orações feitas e por todos os valores de humildade e determinação que sempre me proporcionaram. Sem vocês eu não conseguiria chegar aqui sozinha. Amo muito vocês. Obrigada por tudo.

A vida me ensinou a nunca desistir
Nem ganhar, nem perder mas procurar evoluir
Podem me tirar tudo que tenho
Só não podem me tirar as coisas boas que eu já fiz pra quem eu amo
E eu sou feliz e canto e o universo é uma canção
E eu vou que vou
... História, nossas histórias
Dias de luta, dias de glória

Agradecimentos

Primeiramente eu agradeço a Deus pela saúde e força que me deu para chegar até aqui, pois foram muitas as dificuldades e foi Ele que nunca me abandonou. Aos meus pais, Sônia e Remaclo, que sempre batalharam juntamente comigo ao longo de todo esses anos de estudo, que me ajudaram conquistar esse sonho. Sempre me apoiaram, nunca mediram esforços e sempre orando por mim. Foram e continuarão a ser a minha fortaleza. Aos meus irmãos Guilherme e João Pedro, amo vocês. A minha companheira de vida, Iara, por sempre estar ao meu lado nos dias bons e ruins, e naquelas ruins sempre me colocando para cima com todo seu alto astral juntamente com meus animais, que também fizeram presença com todo o amor que me dão. À toda a minha família que torceu por mim, tias (os), primas (os). Agradeço principalmente a minha avó Vitória por sempre lembrar de mim em todas as suas orações antes de dormir, eu acredito que já fui muito abençoada por isso. Meu muito obrigada! Ao professor Dr. Luiz Ricardo (*in memoriam*) por ter aceitado me orientar em um momento muito decisivo na minha vida, pois não sabia se continuaria morando em Uberlândia, e ele com seu coração enorme me confiou esse trabalho, juntamente com a professora Bia. Obrigada professor Luiz, eu acredito que de onde você estiver está muito orgulhoso de todos nós. Obrigada professor Robinson por ter me “adotado” de forma tão repentina e ser meu orientador. Agradeço a sua paciência, atenção, solitude e ensinamentos ao longo de todos esses anos. A professora Bia eu tenho muito que agradecer, por ter me aceitado desde o início juntamente com o Luis, e por estar comigo até hoje. Saiba que eu aprendi muito com você, não somente com seus ensinamentos, mas aprendi com o ser humano lindo que você é, a sua forma de lidar com os alunos e professores, seu jeito de ser todo engraçado (mas ao mesmo tempo tão profissional), tornando as coisas mais leves mesmo quando não são, e de uma inteligência gigante. Obrigada por tudo! Aos meus amigos e colegas do Nanos (não citarei nomes para não correr risco de errar), as técnicas Luciana e Natássia que contribuíram para minha formação, sempre apoiando um ao outro e muito solícitos quando eu precisava de ajuda. Em especial quero agradecer a Fabiana por ter me ajudado tanto nos planejamentos experimentais. Por toda a paciência e ensinamentos de bancada. Aprendi muito com você. Sua didática é espetacular. Obrigada por tudo. Mario, meu querido jovem. Aprender com você não foi fácil, é espetacular toda essa tecnologia que você está imerso, e me sinto privilegiada por ter aprendido um pouco de tudo isso. Obrigada por todo conhecimento compartilhado, pela paciência e parceria nesse trabalho. Aos professores e secretárias do PPIPA pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção. Aos

membros da banca Dr^a Terezinha, Dr^a Erica, Dr^a Eliane e Dr^a Luciana por aceitarem avaliar esse estudo e contribuir para melhorá-lo. Muito obrigada. À CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro, permitindo a execução desse projeto. Obrigada a todos que não foram citados aqui, mas que contribuíram direta ou indiretamente com essa tese.

RESUMO

Salmonella spp. é o principal patógeno responsável pelas doenças transmitidas por alimentos (DTA). Dentre os sorotipos pertencentes à espécie *S. enterica*, *Salmonella* Enteritidis (SE) é o principal associado a doenças humanas. O controle de SE é obrigatório no Brasil e em muitos outros países, mas sua identificação utilizando testes microbiológicos, seguidos de testes sorológicos e/ou moleculares, considerados padrão ouro, é demorado e trabalhoso para a indústria alimentícia. Essa tese é composta por dois capítulos relativos ao desenvolvimento de um biossensor de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR) para detecção de SE em colônias puras e/ou carcaças de aves, associados ou não a biomarcadores ligantes. O primeiro capítulo descreve o uso da tecnologia *Phage Display* para a seleção de fagos ligantes a SE e posterior detecção no biossensor ATR-FTIR. Após selecionar os dois melhores fagos por *Phage-ELISA*, os peptídeos foram construídos e denominados C1-2 e H1-2. Os peptídeos e anticorpo controle (anti-HM) foram imobilizados em *beads* magnéticas para identificar SE em colônias isoladas e em carcaças de frango. Em seguida, empregamos um biossensor ATR-FTIR para detecção nas amostras, com a ajuda da inteligência artificial (IA). O peptídeo C1-2 foi o que apresentou melhores resultados, demonstrando alta sensibilidade (100%), especificidade (91,67%) e área sob a curva (AUC) (99,2%) em colônias isoladas de SE. Para amostras de carcaça, peptídeo H1-2 apresentou melhores valores de sensibilidade (88,57%), especificidade (75%) e AUC (76,5%) em relação ao C1-2, demonstrando ser um bom potencial para ser utilizado em testes seriados como triagem. No segundo capítulo, combinamos o ATR-FTIR apoiada por algoritmos de inteligência para detectar *Salmonella* Enteritidis (SE) em amostras de colônias puras. Os espectros de infravermelho (IR) foram registrados a partir de cinco sorotipos de *Salmonella* [(SE, *S. Gallinarum* (SG), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH) e *S. Dublin* (SD)] e os dados foram divididos aleatoriamente entre treinamento dados (158 amostras) e dados de validação externa (118 amostras) para construir o banco de dados de *Salmonella*. Os modelos de algoritmos treinados com melhor desempenho preditivo foram *Randon Forest*, *Support Vector Machine* (SVM) e Regressão Logística para os dados de teste (validação externa). Todos os modelos alcançaram um alto valor de precisão de 97,46%. Considerando um bom teste diagnóstico como aquele que apresenta os melhores valores de sensibilidade, especificidade e área sob a curva, os modelos Random Forest (94,74%, 97,98% e 99,7% respectivamente) e SVM (94,74%, 97,98% e 99,6% respectivamente) foram considerados por este estudo

como os melhores para distinguir SE de outros sorovares de *Salmonella*. O conjunto de dados desta tese de doutorado sugere que o desenvolvimento de um biossensor rápido e sustentável, apoiado por algoritmos de inteligência artificial, juntamente com a seleção de moléculas utilizando a tecnologia *Phage display* integrada em testes imunoenzimáticos, tem um potencial significativo para o diagnóstico de *Salmonella*.

Palavras-chave: *Phage display*, *beads* magnéticas, ATR-FTIR, diagnóstico, sustentabilidade, *Salmonella* Enteritidis.

ABSTRACT

Salmonella spp. is the main pathogen responsible for foodborne illnesses (FADs). Among the serotypes present in the *S. enterica* species, *Salmonella* Enteritidis (SE) is primarily associated with human diseases. SE control is mandatory in Brazil and many other countries, but its identification using microbiological tests followed by gold-standard serological and/or molecular tests is time-consuming and laborious for the food industry. His thesis consists of two chapters related to the development of a Fourier Transform Infrared Spectroscopy with Attenuated Total Reflectance (ATR-FTIR) biosensor for the detection of SE in pure colonies and/or bird carcasses, either associated or not with binding biomarkers. The first chapter describes the utilization of Phage Display technology for the selection of SE-binding phages and subsequent detection on the ATR-FTIR biosensor. Following the selection of the top two candidates via Phage-ELISA, the peptides were synthesized and designated as C1-2 and H1-2. These peptides, along with the control antibody (anti-HM), were immobilized on magnetic beads to detect SE in isolated colonies and chicken carcasses. We then utilized an ATR-FTIR biosensor for sample detection, aided by artificial intelligence (AI). The C1-2 peptide exhibited the most promising results, displaying high sensitivity (100%), specificity (91.67%), and an AUC (99.2%) in colonies isolated from SE. For carcass samples, the H1-2 peptide exhibited superior sensitivity (88.57%), specificity (75%), and AUC (76.5%) values compared to C1-2, indicating its potential for implementation in serial tests such as screening. In the second chapter, we combine ATR-FTIR supported by intelligence algorithms to detect SE in pure colony samples. Infrared (IR) spectra were recorded from five *Salmonella* serotypes [(SE, *S. Gallinarum* (SG), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH), and *S. Dublin* (SD)] and the data was randomly split between training data (158 samples) and external validation data (118 samples) to build the *Salmonella* database. The algorithm models with the best predictive performance were Random Forest, Support Vector Machine (SVM), and Logistic Regression for test data (external validation). All models achieved a high accuracy value of 97.46%. Considering an attractive test to detect *Salmonella* as one that presents the best sensitivity, specificity, and area under the curve values, the Random Forest model (94.74%, 97.98%, and 99.7% respectively) and SVM (94.74%, 97.98%, and 99.6% respectively) were deemed by this study as the most effective in distinguishing SE from other *Salmonella* serovars. The dataset from this doctoral thesis suggests that the development of a rapid and sustainable biosensor, supported by artificial intelligence algorithms, along with the selection of molecules using

Phage display technology integrated into immunoenzymatic tests, holds significant potential for *Salmonella* detection.

Keywords: *Phage display*, magnetic beads, ATR-FTIR, diagnostics, sustainability, *Salmonella* Enteritidis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR - Refletância Total Atenuada

ATR-FTIR - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada

AUC - Área Sob a Curva

DTA- Doenças transmitidas por alimentos

ELISA - *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

IR- Espectros de infravermelho

IRE- Elemento de reflexão interna

MLG 4.14 - *Microbiology Laboratory Guidebook*

MKTTn - Caldo de tetracionato-novobiocina Muller-Kauffmann

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola

PIPA/UFU - Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia

Aplicadas

RVS - Caldo Rappaport-Vassiliadis

SD - *Salmonella* Dublin

SE - *Salmonella* Enteritidis

SG - *Salmonella* Gallinarum

SH - *Salmonella* Heidelberg

SIF - Serviço de Inspeção Federal

SPF - Specific Pathogen Free

ST - *Salmonella* Typhimurium

SVE - Serviço veterinário estadual d

SVM - *Support Vector Machine*

SVO - Serviço veterinário oficial

VB - Verde brilhante

XLD - Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	9
1 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
1.1 INTRODUÇÃO	10
1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
1.3 SALMONELLA SPP.	11
1.4 TRANSMISSÃO E VIRULÊNCIA	12
1.5 SINTOMATOLOGIA DE SALMONELLA EM HUMANOS	13
1.6 TRATAMENTO DE SALMONELOSE	14
1.7 EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE	14
1.8 CONTROLE E PREVENÇÃO DA SALMONELOSE	18
1.9 DIAGNÓSTICO	20
1.9.1 Diagnóstico em humanos e em alimentos para consumo humano.	20
1.9.2 Diagnóstico em animais	24
1.10 PHAGE DISPLAY	25
1.11 BIOSSENSOR	26
1.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)	28
2 OBJETIVO	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
3 CAPÍTULO II	49
4 CAPÍTULO III	90

APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado foi originalmente idealizada pelo professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (*in memoriam*) juntamente com a professora Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca. Posteriormente, com o falecimento do meu orientador, a pesquisa foi continuada com o professor Dr. Robinson Sabino da Silva. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Nanobiotecnologia Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – IBTEC/UFU e Laboratório de Doenças Infecciosas (LADOC) – FAMEV/UFU.

A estrutura deste trabalho seguiu as normas do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA/UFU), apresentando as seguintes seções.

- Fundamentação teórica– Revisão de literatura sobre a bactéria do gênero *Salmonella*, especificando o sorovar Enteritidis, *Phage Display* e ATR-FTIR.
- Capítulo II – “*Development of an ATR-FTIR biosensor based on magnetic nanoparticles coupled to specific Phage Display-derived peptides for the detection of Salmonella Enteritidis*”. Artigo para ser submetido ao periódico “*Biotechnology Journal*” com fator de impacto 5,726 cujos critérios para submissão estão disponíveis em: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/book-authors/prepare-your-manuscript/index.html>.
- Capítulo III – “*Is it possible identify Salmonella Enteritidis using attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy associated with artificial intelligence (AI)?*”. *Research paper* para ser submetido ao periódico “*LWT - Food Science and Technology*” com fator de impacto de 9,6, cujos critérios para submissão estão disponíveis em: <https://www.sciencedirect.com/journal/lwt/publish/guide-for-authors>.

1 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae* e, atualmente, é classificado em duas espécies: *Salmonella bongori* com 23 sorovares (variedades sorológicas) e *Salmonella enterica*, com 2.610 sorovares (Franco; Ladgraf, 2004; Tortora; Case; Funke, 2016; Zawadzki, 2016). A espécie *S. enterica* é responsável por aproximadamente 99% das infecções (Kurtz; Goggins; McLachlan, 2017), tendo *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium e Gallinarum os principais responsáveis em causar doença em humanos e animais (OPAS, 2022).

O controle de *Salmonella* é obrigatório na produção animal, em especial nas aves, por serem mais associadas na transmissão da doença para os seres humanos, por meio do consumo da carne e ovos (Ribeiro; Simão; Weber, 2022). Todos os países produtores e exportadores de carne e ovos tem a responsabilidade de controlar a *Salmonella* em granjas ou frigoríficos (ABNT, 2021). Nesse contexto, o Brasil se destaca por ser um grande produtor e exportador (Brasil, 2022a).

Salmonella enterica sorovar Enteritidis ou *Salmonella* Enteritidis (SE) tem sido responsável por surtos em todo o mundo, principalmente no Brasil, causando casos de toxinfecções alimentares (Fernandes *et al.*, 2006; Tavechio *et al.*, 1996). O controle precisa ser feito e passa necessariamente pelo diagnóstico efetivo e rápido. Pelas normas da ISO NBR ISO 6579-1 e Ministério da Agricultura (ABNT, 2021), para detectar a presença de *Salmonella spp.* em amostras de consumo humano e animal, são necessários testes microbiológicos, seguidos de confirmação por bioquímica, sorologia PCR. A PCR embora com alta sensibilidade e especificidade, ainda enfrenta problemas já que é necessário diferenciar sorotipos e o desenvolvimento de *primers* nem sempre é fácil devido à alta similaridade entre os diferentes sorotipos (Melo *et al.*, 2018; Mohammed; Thapa, 2020).

A evolução no desenvolvimento de biossensores vem sendo favorecida pelo aumento da compreensão molecular e bioquímica da resposta analítica e das suas respectivas tecnologias (Melo *et al.*, 2018). Os dispositivos portáteis miniaturizados existentes permitem análises *in-situ*, apresentando uma alta sensibilidade, seletividade,

reprodutibilidade, custo acessível, de fácil uso, com respostas rápidas e além de tudo, com limite de detecção menor do que os métodos convencionais (Bhalla *et al.*, 2016a; Kaya *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) tem sido nos últimos tempos uma das técnicas mais poderosas para análise estrutural e reconhecimento direto espectral de materiais biológicos e suas interações (Glassford; Byrne; Kazarian, 2013; Goormaghtigh; Raussens; Ruyschaert, 1999; Tiernan; Byrne; Kazarian, 2020). Então, o objetivo desse estudo foi desenvolver biossensores baseados em ATR-FTIR e inteligência artificial, com ou sem ligantes específicos a partir de colônias puras e/ou carcaças de aves.

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.3 *SALMONELLA SPP.*

Salmonella (assim denominadas em homenagem ao seu descobridor Daniel Salmon) é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae e são classificadas como bastonetes de 0,5 a 0,7 por 1 a 3 micrômetros, gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, lactose, urease e oxidase negativos. A maioria dos sorotipos de *Salmonella* é móvel devido à presença de flagelos peritríquios, possuem um pH de crescimento ótimo de 7, podendo variar entre 4 e 9, e uma temperatura ótima de crescimento entre 35°C e 37°C (Franco; Ladgraf, 2004; Tortora; Case; Funke, 2016; Zawadzki, 2016).

A espécie *S. enterica*, responsável pela maior quantidade de sorovares, é subdividida em 6 subespécies, sendo elas: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (OPAS, 2022). A classificação em subespécies é feita com base na composição antigênica dos flagelos (antígeno H), da parede celular (antígeno O) e dos antígenos capsulares (antígenos Vi) (Azevedo, 2009).

Em aves, os sorovares Pullorum, Gallinarum (causador do tifo aviário), Heidelberg, Bredeney, Hadar e Agona também são encontrados em frigoríficos e granjas avícolas (OPAS, 2022; Ribeiro; Simão; Weber, 2022). Identificar esses sorovares nas aves é imprescindível para a saúde pública, pois as aves apenas apresentam uma infecção subclínica intestinal seguida de uma infecção sistêmica curta e, posteriormente, tornam-se portadoras crônicas (Ribeiro; Simão; Weber, 2022).

Outros sorovares são adaptados a hospedeiros específicos, como a *S. Tiph* ao ser humano, *S. Choleraesuis* aos suínos, *S. Abortus-equi* aos equinos, *S. Dublin* aos bovinos, *S. Abortus-ovis* aos ovinos e *S. Gallinarum* às aves (Popoff; Bockemühl; Gheesling, 2004). Por outro lado, os sorovares Enteritidis, Typhimurium, Anatum, Derby e Panama e outros, não possuem nenhum tipo de especificidade, podendo afetar diferentes hospedeiros e levarem a um quadro sintomático ou assintomático (Zero; Rodrigues, 2017).

1.4 TRANSMISSÃO E VIRULÊNCIA

Salmonelas são bactérias que se difundem amplamente na natureza, existindo uma vasta gama de fontes de infecção que se dá pela precariedade do saneamento básico, principalmente em relação ao consumo de água inadequada e ao consumo de alimentos crus ou mal - cozidos como ovos, carnes, laticínios e também vegetais, hortaliças e frutas (OPAS, 2022; Trawinska *et al.*, 2008).

Cerca de 50 sorovares estão envolvidos na ocorrência de doenças em humanos e animais (Ford *et al.*, 2016) e, de modo geral, os alimentos são responsáveis por um terço dos casos de infecção por *Salmonella* (Besser, 2018). Identificar a fonte de alimento que está contaminada é difícil, porém, é uma forma importante para prevenir a propagação da doença. Um estudo feito na Austrália, mostrou um aumento sustentado de casos entre 2000 e 2013, envolvendo *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* não-Typhimurium, nos quais mais de 70% dos casos, a fonte era a comida (Ford *et al.*, 2016).

A infecção por *Salmonella* ocorre pela ingestão de alimento contaminados, e uma vez a bactéria alcançando a mucosa intestinal, com o auxílio das fimbrias, ela adere à parede, produz invaginações na membrana celular por meios de vesículas ligadas a essas, permitindo então a sua entrada e replicação na circulação sanguínea, podendo

desencadear uma septicemia (Kawazoe, 2009; Tortora; Case; Funke, 2016; Zawadzki, 2016).

As galinhas e outras aves podem transportar o microrganismo e a exposição a estas aves tem sido associada a infecção (Seif *et al.*, 2019). Para aves de interesse comercial, a transmissão pode acontecer pela contaminação fecal da casca do ovo durante a postura, pela transmissão horizontal no incubatório (por caixas, no transporte e com aves selvagens), nas granjas a transmissão pode ocorrer por vetores (moscas, baratas, besouros e pulgas) e fômites, além de ser possível também pela água e ração (apenas se for contaminada após a peletização) (Ribeiro; Simão; Weber, 2022).

Existem alguns fatores de virulência que são comuns a pertencentes deste gênero, como a presença de fimbrias e atuação do lipopolissacarídeo que auxilia na fixação de superfícies, como a mucosa intestinal, e colonização. O sistema de secreção tipo III atua na transferência de um vasto número de sinalizadores para a célula hospedeira que resultam em eventos celulares que colaboram para a infecção da bactéria (Forsythe, 2013).

1.5 SINTOMATOLOGIA DE *Salmonella* EM HUMANOS

Os sintomas da maioria das pessoas infectadas com *Salmonella* começa a desenvolver com 12 a 72 horas após a infecção, com duração de quatro a sete dias. Os sintomas iniciais são náuseas, vômito e, posteriormente, progride para dores abdominais e diarreia, variando de brandas à severas (CDC, 2019; WHO, 2023)

Sintomas como febre alta, diarreia por mais de três dias que não apresenta melhora, fezes sangrentas, vômitos prolongados e sinais de desidratação como boca e garganta seca, tontura ao levantar e baixo volume de urina, precisa-se de procurar atendimento médico rápido pois são casos potencialmente fatais (CDC, 2019; FDA, 2019).

Para que os primeiros sintomas de gastroenterite surjam é necessário em média 100.000 organismos para que ocorra uma infecção de fato (Shinohara *et al.*, 2008). No entanto, pacientes idosos, crianças, gestantes e pessoas com sistema imunológico comprometido têm maior probabilidade de ter infecções graves por salmonelose pois a infecção pode disseminar por meio da corrente sanguínea e levar o paciente a óbito, caso

ele não seja prontamente tratado da forma correta (FDA, 2019; WHO, 2018; Who, 2022). Não existem manifestações clínicas específicas para *S. Enteritidis* (Omwandho; KUBOTA, 2010).

1.6 TRATAMENTO DE SALMONELOSE

A maioria dos casos de gastroenterite causados por *Salmonella spp.* não requer tratamento, principalmente para portadores saudáveis, uma vez que pode aumentar os efeitos adversos e prolongar a eliminação da bactéria (CDC, 2023; Leedom; Spickler, 2013).

Pacientes com salmonelose severa podem ser tratados com antibióticos de primeira escolha se a bactéria não for resistente. Os medicamentos de segunda ou terceira geração podem ser menos eficazes, administrados por via intravenosa em vez de por via oral, mais são tóxicos e mais caros. Os antibióticos fluoroquinolonas, azitromicina e cefalosporinas de terceira geração são recomendados para infecções graves (CDC, 2023).

Em idosos, bebês e pessoas imunodeprimidas, que são propensas a septicemia e complicações, podem ser administrados antibióticos para a gastroenterite. O uso desnecessário de antibióticos para tratamento de *Salmonella* tem causado o aparecimento de cepas resistente a múltiplos fármacos, trazendo sérios problemas (CDC, 2023; Leedom; Spickler, 2013).

1.7 EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE

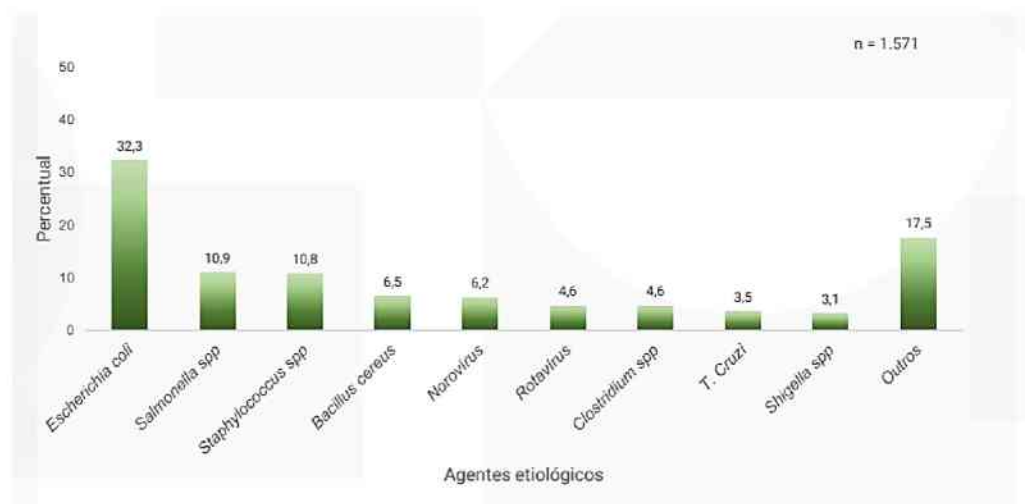
As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) são aquelas causadas pela ingestão de água ou alimentos contaminados por microrganismos patogênicos e tem se tornado um grande problema relacionado à saúde populacional pois representam um importante causa de morbidade e mortalidade que vem crescendo mundialmente (Silva, 2017). Cerca de

600 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos são notificados anualmente em todo o mundo, com 420.000 mortes (OPAS, 2022).

Dentre as doenças transmitidas por alimentos, encontramos na literatura dados recentes de surtos provocados por *Salmonella* em todo o mundo, causando doença diarreica (Popa; Papa, 2021). Dados do CDC e USDA, nos Estados Unidos, estimam que *Salmonella* causa aproximadamente 1,35 milhão de doenças, resultando em 26.500 hospitalizações e 420 mortes (CDC, 2024b), sendo o sorotipo Enteritidis (17,5%) e Typhimurium (15%) os mais prevalentes, responsáveis por metade de todas as infecções humanas (CDC, 2009; USDA, 2023).

No Brasil, dados epidemiológicos do Ministério da Saúde, de 2013 a 2022, notificou 6.523 surtos em todo o país, com 112 óbitos confirmados, sendo a região sudeste com os maiores números de casos. As bactérias dos gêneros *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* são as principais causadoras de surtos (Figura 1) (Brasil, 2023). Nesse período, foram identificados 1.571 agentes etiológicos causadores de DTA, sendo *Salmonella spp.* o segundo patógeno mais encontrado (10,9%), perdendo apenas para *Escherichia coli* (32,3%) (Brasil, 2023).]

Figura 1: Distribuição dos agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTHA, Brasil, 2013 a 2022* (Brasil, 2023).



Fonte: Sinan/SVS/Ministério da Saúde. * Dados preliminares, sujeitos a alterações

Casos de infecção de *Salmonella* estão espalhados por todo o mundo. *Salmonella enterica* foi identificado na Coreia entre os anos de 1998 e 2007 como um dos principais patógenos de origem alimentar. A prevalência encontrada durante esse período foi dos

sorotipos de *Salmonella* Typhi, Enteritidis e Typhimurium. Esses sorotipos foram apresentando declínio nas suas taxas de infecção ao mesmo tempo que foram aparecendo casos de infecção por *Salmonella* sorotipo Infantis, e outros sorotipos mais raros (Kim, 2010).

Um estudo de revisão de todas as infecções diagnosticadas por *Salmonella spp.* foi realizado no período de 1999 e 2008, em Cambridge, no Reino Unido. Foram identificados 88 diferentes sorotipos da bactéria que causaram 1.003 casos de gastroenterite, sendo que os sorotipos mais prevalentes foram Enteritidis (59%), Typhimurium (4,7%), Virchow (2,6%), Newport (1,8%) e Braenderup (1,7%) (Matheson *et al.*, 2010). Na Tunísia, um estudo relatou uma prevalência alta de *Salmonella spp.* em frango cru (>50%), apesar dos esforços para melhorar a higiene nas plantas de processamento de aves (Abbassi-Ghozzi *et al.*, 2012).

No Brasil, os casos estão espalhados em todos os estados. Um estudo analisando sessenta cortes de carnes de frango foi realizado em um comércio varejista de João Pessoa (PB). Essas carnes estavam acondicionadas em embalagens à base de isopor e expostas à venda sob refrigeração. A análise microbiológica foi realizada demonstrando um alto índice de contaminação de *Salmonella spp.* (71,7%), *E. coli* (95%) e *S. aureus* (43,35%) (Silva *et al.*, 2002).

No Estado de São Paulo, entre os anos de 2004 a 2020, um total de 9.014 isolados de *Salmonella* foram encontrados em amostras humanas e não humanas (animais, alimentos e ambientes), sendo o sorotipo *S. Enteritidis* o mais frequentemente notificado nas infecções humanas, representando 41,9% (1.489) de todos os isolados, seguido por *S. Typhimurium* com 11,4% (406) (Fernandes *et al.*, 2022). No estado de Pernambuco, entre 2018 e 2019, dos 34,4% de carcaças de frango comercializadas na cidade positivas para *Salmonella spp.*, todos eles mostraram a capacidade de formar biofilmes e ainda mais, 61,9% dos isolados demonstraram ser resistentes a pelo menos um antibiótico e 38% foram resistentes a múltiplas drogas (Melo, 2023). Mostrando mais uma vez a capacidade dessas bactérias de acumular vários mecanismos de virulência e resistência aos antimicrobianos, causando perdas econômicas consideráveis, além da necessidade de controles efetivos para conter esse microrganismo (Sivasankar *et al.*, 2020).

Além da contaminação em carcaças de frango, percebemos que carne bovina também apresenta contaminação. Um total de 27% amostras de carne moída estavam contaminadas com *Salmonella spp.* no Distrito Federal (Monteiro *et al.*, 2018). Na cidade de Ceres-GO, analisando carne moída comercializada em cinco diferentes supermercados

da cidade, constatou que em todas as amostras apresentaram alto crescimento de colônias características de *Salmonella spp.*, impossibilitando a contagem das colônias (Santos; Pereira; Biângulo, 2023). Na cidade de São Luiz, no Maranhão, também foi detectado *Salmonella* (4,65%) em amostras de frango e peixe (Souza *et al.*, 2023). As carnes de sol no Ceará também foram constatadas presença de *Salmonella spp.* acima do limite aceitável apresentando um risco para a saúde da população consumidora (Coelho *et al.*, 2023). Apesar dessas contaminações encontradas, a legislação brasileira é bem clara por meio da IN 83/2003, estabelecendo que a carne moída comercializada no Brasil deve apresentar-se ausente de *Salmonella spp.* (Brasil, 2003).

De modo geral, somente 10% do total de surtos de origem alimentar no Brasil são notificados, demonstrando mais uma vez as falhas no sistema de notificação e de fiscalização (Forsythe, 2013; Germano *et al.*, 1993). Somente *S. Typhi*, causadora da febre tifoide, possui notificação compulsória obrigatória no país, mas ainda assim, apesar de sua importância epidemiológica, existe uma grande subnotificação da doença. As razões são diversas, pois são inúmeros casos da doença que não são diagnosticados, encontra-se dificuldades de acesso aos serviços de saúde, o não reconhecimento de casos suspeitos e por fim, o uso precoce de antimicrobianos em situações clínicas indefinidas, o que possibilita o surgimento de cepas resistentes. Devido a todos esses fatores, torna-se difícil a coleta de dados que tenham significado estatístico (Brasil, 2002).

As doenças veiculadas por alimentos constituem atualmente um dos problemas de saúde mais disseminados e um importante fator de redução da produtividade econômica. Um alto índice de contaminação por *Salmonella spp.* é encontrado em cortes de carne em todo o Brasil, demonstrando a falta de saneamento adequado que temos no país, onde a bactéria é encontrada facilmente nos alimentos sendo assim transmitida para os humanos (Romão, 2023). O fato do Brasil ser o maior exportador de carne de aves e pela grande exigência dos países importadores (Back, 2002), uma maior necessidade de controle sanitário é reforçada, visando a redução dos índices de contaminação de carcaças de frango por *S. Enteritidis* (Tessari *et al.*, 2003).

Atenção deve ser dada não somente a contaminação de carnes destinadas ao consumo humano, mas também a infecção por *Salmonella* em animais. No Brasil, um estudo realizado em 2009, na região sul do Maranhão, identificou por provas bioquímicas e sorológicas que a *Salmonella Enteritidis* foi o agente etiológico responsável pelo elevado índice de mortalidade em pintinhos em uma propriedade avícola. Segundo os relatos, cerca de 1000 pintinhos com uma semana de idade, em média, morreram no

intervalo de três dias. A taxa de incidência calculada foi de 66,9%. Um adequado manejo e higiene do ambiente são fundamentais para a prevenção desta enfermidade. Falhas no manejo como contaminação da ração desencadeiam graves perdas como foi relatado neste caso (Pigatto, 2009).

De um modo geral, vemos que a epidemiologia da salmonelose humana é influenciada por hábitos alimentares e algumas condições de preparação, sendo que o armazenamento de grande quantidade de alimentos, manuseio, controle inadequados e temperaturas desfavoráveis são processos que favorecem o aparecimento e multiplicação da *Salmonella* (Baú; Siqueira; Mooz, 2009). À medida que houve o aumento do processo de globalização e industrialização de aves domésticas e ovos, foi observado um aumento de *Salmonella spp.* nesse comércio, principalmente *Salmonella* Enteritidis, dita como a possível desencadeadora das epidemias de salmonelose não-tifóide em humanos (WHO, 2018).

1.8 CONTROLE E PREVENÇÃO DA SALMONELOSE

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo (Lourenço *et al.*, 2004) devido às suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida no seu controle (Guérin; Vold; Aavitsland, 2005). O Brasil representa uma das maiores potências mundiais na produção de carne bovina, possuindo o segundo maior rebanho comercial (Abiec, 2020). O crescimento do consumo tem trazido pontos positivos quando se trata da economia, no entanto, a qualidade dos produtos diminuiu, o que interfere na saúde alimentar (Franciele, 2019).

O controle de *Salmonella spp.* na indústria avícola brasileira passou a ser implantado em 1994 com a Portaria nº 193, de 19 de setembro, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que estruturou e consolidou o Programa Nacional de Sanidade Avícola - PNSA (Brasil, 1994) e norteou o desenvolvimento de programas sanitários para controle das principais doenças aviárias, dentre elas a salmonelose. A normativa n.20, de 21 de outubro de 2016 se tornou importante também pois estabeleceu o controle e o monitoramento de *Salmonella spp.* nos estabelecimentos avícolas

comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor. Apesar dos esforços para o controle do patógeno na produção avícola e na indústria, os índices de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este gênero continuam altos.

Medidas de controle são sempre avaliadas e atualizadas, como por exemplo, a OMS reuniu recentemente para discutir sobre o controle pré e pós-colheita de *Salmonella* spp. em carne de aves e então fornecerem medidas de controle na cadeia produtiva de frangos de corte (WHO, 2022). Porém, surtos zoonóticos e de origem alimentar causados por *Salmonella* são reportados em todo o mundo, como podemos observar pelos dados levantados pelo CDC (CDC, 2024a).

Sabe-se que os ovos são uma fonte de infecção por *Salmonella* e alguns métodos de descontaminação estão disponíveis como: irradiação gama, liofilização, ar quente, aquecimento por micro-ondas e a pasteurização, sendo esse último o método mais comumente utilizado (Popa; Papa, 2021).

Os antibióticos têm sido utilizados como forma de controle bacteriano em animais, porém, o crescente aumento de sua utilização provocou uma aceleração do surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos, que podem ser transmitidas aos humanos por meio do consumo de carne e outros produtos de origem animal. (Agyare *et al.*, 2018; Medeiros *et al.*, 2011; Romão, 2023). Por fim, para garantir a eficácia dos programas de controle, há necessidade de vigilância contínua e partilha de dados de susceptibilidade antimicrobiana para *Salmonella* entre países de todo o mundo, para garantir que somente casos bem específicos façam o uso consciente (Brasil, 2022a; de Oliveira *et al.*, 2012).

Além do controle desta doença em animais ser de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem esses surtos, também é importante seguir as medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose na população humana. A prevenção requer medidas de controle em todas as fases da cadeia alimentar, que vai desde a produção agrícola até ao processamento, fabricação e preparação de alimentos, tanto em estabelecimentos comerciais como em casa (Who, 2022).

Alguns pontos principais podem ser adotados como estratégias de prevenção, como seleção da matéria-prima, utensílios e equipamento que sejam cuidadosamente higienizados, fornecimento de água potável, adequado sistema de tratamento de lixo e esgoto, afastamento dos portadores assintomáticos da área de produção e métodos de

preservação e de transporte adequados (Shinohara *et al.*, 2008). Devido ao seu impacto na segurança alimentar da população, há uma busca constante por melhorias nas estratégias para reduzir a contaminação por *Salmonella spp.* no Brasil, mas ainda é necessário um aprofundamento contínuo nessa área de estudo (Romão, 2023).

Com isso, as medidas para controle e prevenção baseiam em biossegurança, onde há algumas práticas que podem ser adotados pelas empresas. Como exemplo, tem-se a implementação de políticas de ações de educação em saúde, onde irá se destacar os hábitos de higiene pessoal como a lavagem correta das mãos entre as pessoas que manipulam alimentos, observando cuidados na preparação, manipulação, armazenamento e distribuição de alimentos (Shinohara *et al.*, 2008; Špačková *et al.*, 2019). Conservar os produtos alimentícios prontos para consumo refrigerados ou aquecidos, à 60°C ou mais, limpar e desinfetar as caixas d'água de instituições públicas e domiciliares a cada 6 meses ou com intervalo menor, e filtrar, ferver ou clorar a água com hipoclorito de sódio a 2,5% em caso da não disponibilização de água potável ou tratada também são medidas a serem feitas para evitar a proliferação de microrganismos (Brasil, 2022b).

OMS está acelerando desenvolvimento de vacinas contra os principais patógenos endêmicos, no qual *Salmonella* está incluso (Who, 2023), porém, o uso de vacinas para controle pode apresentar algumas desvantagens como causar confusão na interpretação de resultados e dificuldade de distinguir sorologia vacinal e da enfermidade (Shivaprasad, 2000; Wibisono *et al.*, 2020).

1.9 DIAGNÓSTICO

1.9.1 Diagnóstico em humanos e em alimentos para consumo humano

O diagnóstico laboratorial de *Salmonella* se baseia na identificação do agente. Quase todos os membros do gênero *Salmonella* são potencialmente patogênicos e a investigação é feita em amostras clínicas do paciente suspeito como sangue (hemocultivo), fezes (coprocultura), secreções provenientes de outros sítios e em amostras de alimentos suspeitos de terem veiculado a infecção (Brasil, 2021). Para isso,

existe uma grande quantidade de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares que são usados para isolar e identificar as salmonelas (Tortora; Case; Funke, 2016).

Em humanos podemos utilizar diferentes amostras para realizar o diagnóstico, e a amostra depende do tipo de infecção. Em casos de infecção intestinal, recomenda-se como material de análise, as fezes, já as infecções sistêmicas, aconselha-se a coleta de sangue (hemocultura), baço e medula óssea (*post mortem*) (Zawadzki, 2016). Para realização de uma inoculação direta, pode-se utilizar o ágar MacConkey, ágar verde-brilhante ou ágar XLD (37°C por até 48 horas). Já se a inoculação feita precisa ser em caldo enriquecido, utiliza-se o meio de ágar XLD ou ágar VB com caldos enriquecidos de selenito de ferro, Rappaport ou tetracionato (37°C por até 48 horas). Se houver colônias suspeitas nos meios anteriores, pode-se utilizar o meio de ágar TSI e caldo lisina descarboxilase (Zawadzki, 2016).

Além de coletar amostras diretamente do indivíduo, pode ser feito o isolamento da *Salmonella spp.* em alimentos. A detecção de *Salmonella* em produtos destinados a consumo humano é regulamentado nos Estados Unidos pela normativa MLG 4.14 (Microbiology Laboratory Guidebook) da FSIS, onde descrevem o procedimento de isolamento e identificação de *Salmonella* em carnes, aves, ovos pasteurizados, produtos siluriformes (peixes) e carcaças e esponjas ambientais (FSIS, 2023). No Brasil, temos uma normativa semelhante para detecção de *Salmonella*, que é a NBR ISO 6579-1, aplicada à produtos destinados ao consumo humano e à alimentação de animais; amostras ambientais na área de produção e manipulação de alimentos; amostras da fase de produção primária, como fezes de animais, poeira e swabs (ABNT, 2021).

Basicamente, a detecção de *Salmonella* requer quatro etapas sucessivas. O primeiro passo é o pré-enriquecimento da amostra em meio líquido não seletivo, onde irá permitir a detecção de um baixo número de *Salmonella* ou de recuperar células injuriadas que tiveram perda ou alteração de suas funções celulares sendo incapazes de se proliferar. Logo, uma alíquota da amostra é incubada com água peptonada entre 34°C e 38°C, por 18 h. A segunda parte é feito um enriquecimento em meio seletivo, que irá promover o aumento contínuo de *Salmonella* e inibir a multiplicação da microbiota acompanhante. No outro dia, após a incubação, 1ml da amostra será colocado em caldo de tetracionato-novobiocina Muller-Kauffmann - MKTTn incubado entre 34°C e 38°C, e 0,1ml da amostra em caldo Rappaport-Vassiliadis - RVS a 41,5°C, ambos por 24h. O ágar MSRV destina-se à detecção de cepas móveis de *Salmonella* e não é apropriado para a detecção de cepas de *Salmonella* não móveis. A próxima etapa é o plaqueamento em meio sólido

seletivo, onde preferencialmente, colônias de *Salmonella* possam se desenvolver, apresentando características típicas que as distinguem dos competidores em função da inibição e do aspecto macroscópico das colônias. Nessa etapa, os meios Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD e verde brilhante- VB são usados para incubar as amostras do passo anterior, a 37°C por 24h. Por fim, para a confirmação, as colônias presuntivas de *Salmonella* são subcultivadas e sua identidade é confirmada por meio de testes bioquímicos e sorológicos apropriados (ABNT, 2021; Brasil, 2021). Logo, o padrão ouro é considerado confiável, no entanto, dependem de uma sequência complexa de etapas e requerem vários dias para o resultado (Andrews *et al.*, 2023).

Existem testes bioquímicos que são disponíveis comercialmente para a confirmação sorológica utilizando antissoro polivalente e para a sorotipagem utiliza-se o antissoro específico “H” ou “O” (Zawadzki, 2016). Esses anticorpos específicos podem ser utilizados para diferenciar os sorovares de *Salmonella* por um sistema conhecido como esquema de Kauffmann-White. Esse esquema designa um organismo por números e letras que correspondem aos antígenos específicos da cápsula, da parede celular e do flagelo do organismo, que são identificados pelas letras K, O e H, respectivamente. Muitas salmonelas são denominadas somente pelas fórmulas antigênicas. Por exemplo, a fórmula antigênica para *S. Enteritidis* é O1,9,12:H,g,m (Tortora; Case; Funke, 2016).

Testes baseados em ensaios imunológicos empregam anticorpos mono ou policlonais para a detecção de *Salmonella*. Tais anticorpos são capazes de reconhecer antígenos (somáticos, flagelares ou capsulares) em uma variedade de matrizes de alimentos. Os ensaios imunológicos incluem, principalmente, o teste ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), testes de aglutinação em látex e ensaios de imunodifusão. O teste ELISA é o mais utilizado nessa categoria para detecção de *Salmonella*, sendo comercialmente disponível em uma grande quantidade de kits (FSIS, 2016).

Os métodos imunológicos apresentam algumas limitações para detecção de *Salmonella*. As limitações são a necessidade de uma etapa prévia de enriquecimento da amostra para obter o número adequado de células, possibilidade de reações cruzadas com antígenos de espécies filogeneticamente próximas, sensibilidade e especificidade dependem em grande parte da microbiota da amostra, da complexidade da matriz do alimento e das substâncias inibidoras (por exemplo, gorduras, proteínas, polissacarídeos, metais pesados, antibióticos e compostos orgânicos) (Melo *et al.*, 2018).

Métodos moleculares tem sido muito utilizado nas pesquisas recentes, sendo a categoria de métodos alternativos que mais cresceu, apresentando vários kits disponíveis no mercado (FSIS, 2016), e se mostrando superior à sorotipagem tradicional por apresentar uma melhor padronização, reprodutibilidade e maior capacidade de discriminação (Popa; Papa, 2021).

O ensaio de PCR (Polymerase Chain Reaction) é o teste molecular mais usado na detecção de *Salmonella* em alimentos, sendo feito dentro de duas ou três horas. A técnica foi melhorada por meio da automatização nas etapas de extração do DNA, amplificação e detecção, o que acelerou a capacidade de resposta dos laboratórios para um diagnóstico emergencial de *Salmonella* numa ampla variedade de matrizes de alimentos (Melo *et al.*, 2018).

Atualmente, há uma grande diversidade de testes comerciais como a técnica de qPCR ou PCR em tempo real. Essa inovação tecnológica trouxe a capacidade de gerar resultados quantitativos, permitindo que se acompanhe a reação de amplificação em tempo real de forma mais rápida e precisa, por meio da detecção do sinal de fluorescência que é produzido de forma diretamente proporcional ao número de sequências amplificadas (amplicons) (Melo *et al.*, 2018).

O ensaio de hibridização com sonda de DNA, também bastante utilizado para detecção de bactéria, baseia-se na utilização de uma sonda de DNA com uma sequência complementar à sequência-alvo do DNA da bactéria. No final do processo tem a formação de um híbrido estável com o DNA marcado, que pode ser detectado por meio de técnicas como radioisótopos ou reações enzimáticas. Esse método apresenta uma alta especificidade, sensibilidade e são eficazes para rastrear rapidamente um grande número de amostras, porém, exigem uma etapa de pré-enriquecimento para alcançar a concentração adequada à sensibilidade, logo o tempo médio de análise é de 48 horas (Melo *et al.*, 2018).

Percebemos então que os testes moleculares apresentam vantagens quanto a sensibilidade, especificidade, maior controle do processo, menor risco de contaminação, possibilidade de combinação com outros métodos permitindo identificação mais rápida, porém, os equipamentos e reagentes ainda são menos acessíveis para os países em desenvolvimento (Melo *et al.*, 2018; Mohammed; Thapa, 2020).

1.9.2 Diagnóstico em animais

A sorologia pode ser útil para o diagnóstico em um rebanho e para identificar portadores em programas de erradicação de *Salmonella spp.* em aves. Os testes sorológicos incluem testes de aglutinação e testes ELISA. Alguns ELISAs podem ser utilizados para exames em leite a granel, em amostras de tecido muscular descongelado (fluido tecidual) de suínos, em ovinos e bovinos. A maioria dos testes sorológicos detectam um número limitado de sorovares e sorogrupos. A sorologia é de uso limitado em um único indivíduo, pois os anticorpos não aparecem até duas semanas após a infecção, podendo também estar presentes em animais não infectados (Leedom; Spickler, 2013; Zawadzki, 2016).

Em aves, o diagnóstico começa no aparecimento de sinais clínicos e nas lesões encontradas no exame necroscópico, mas para o diagnóstico definitivo é necessário isolar e identificar o agente etiológico em meios de cultura. Testes sorológicos e PCR também podem ser utilizados (Santos; Murer, 2018)

Em estabelecimentos avícolas comerciais de frangos, a normativa nº 20 de 21 de outubro de 2016 estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella spp.* nas aves. Primeiramente, amostra de swabs de arrasto, propés ou de fezes são coletadas dos lotes de frangos, de forma que seja próximo ao dia do abate, mas que os resultados cheguem antes do envio das aves ao abatedouro, pois os resultados devem ser enviados para a empresa de abate. No momento da coleta, as aves e o ambiente não deverão estar sob efeito de antimicrobianos para bactérias gram-negativas. Após os resultados, o médico veterinário que realiza o controle sanitário deverá fazer um relatório conforme os procedimentos do serviço veterinário oficial (SVO). Os estabelecimentos passarão por uma avaliação clínica, epidemiológica e zootécnica por um médico veterinário, cujo tempo entre cada avaliação é determinado se o estabelecimento é ou não registrado pelo serviço veterinário estadual (SVE) (Brasil, 2016).

Em casos de resultados positivos, o médico veterinário responsável providenciará que o estabelecimento fermente as camas de todos os aviários do núcleo e descarte toda a cama e esterco do núcleo após ser fermentada. Em seguida, precisar realizar a limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos, fazer adesão ao vazio sanitário por quinze dias, investigar a fonte de infecção e transmissão e implementar um novo plano de ação para prevenção. O SVO realizará coletas aleatórias nos estabelecimentos avícolas. Nos

estabelecimentos de abate, entretanto, os lotes positivos para *Salmonella* serão abatidos separadamente dos demais lotes, seguindo de imediata higienização das instalações e equipamentos. Por sua vez, a produção será sequestrada e destinada para tratamento térmico, ou fabricação de carne mecanicamente separada (Brasil, 2016).

1.10 PHAGE DISPLAY

A tecnologia de *Phage Display* ou exposição de biomoléculas em fagos é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas finalidades. Essa técnica foi originalmente introduzida em 1985 por Geroge Smith, quando conseguiram a expressão da enzima de restrição EcoRI por meio da fusão com a proteína três (pIII) do capsídeo de bacteriófagos, abrindo caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais (Smith, 1985), um bacteriófago que infecta uma variedade de bactérias Gram-negativas, frequentemente, a *Escherichia coli* usando o *pilus* sexual como receptor (Benhar, 2001).

A técnica baseia-se no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína endógena (Barbas *et al.*, 2001). Quanto maior a variedade de peptídeos da biblioteca, maiores são as chances de expor fagos a uma proteína que possam ter a afinidade de ligação.

As bibliotecas de peptídeos podem ser adquiridas comercialmente e possuem um vasto número de peptídeos de um dado tamanho (10^7 - 10^9), onde suas sequências são geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos (Azzazy; Highsmith, 2002).

A seleção de sequências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning* (Vodnik *et al.*, 2011). O *biopanning* é realizado pela incubação da biblioteca de peptídeos expostos em fagos contra o alvo, da forma que serão realizadas três ou quatros ciclos de seleção

(ciclos de ligação, eluição e amplificação) e então no final do processo, somente estarão fagos com sequências específicas contra o alvo. Os clones individuais são então caracterizados por sequenciamento de DNA, *western blotting* ou ELISA (Smith, 1985).

Bibliotecas de peptídeos geradas por *phage display* tem apresentado um grande impacto na imunologia, biologia celular, descoberta de medicamentos e outros fármacos (Willats, 2002). Peptídeos sintéticos também têm sido amplamente utilizados nos últimos tempos para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico para detecção de diversas doenças como artrite (Gómara; Haro, 2013), câncer (Moral; Siahaan, 2017) e bactérias patogênicas (Alban *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007). Além disso, peptídeos sintéticos na forma de antígeno(s) apresentam boas características, como serem mais estáveis, fáceis de armazenar mesmo em temperatura ambiente, altamente específicos e podem ser sintetizados em massa (Gómara; Haro, 2007).

Devido a busca crescente da necessidade de segurança alimentar, métodos de detecção de *Salmonella* combinando bacteriófagos tem sido mostrado na literatura. Alguns dos métodos que podemos citar inclui PCR em tempo real de base molecular (Botsaris *et al.*, 2013; Galikowska *et al.*, 2011), separação imunomagnética baseada em imunoenaios de fluorescência (Bennett *et al.*, 1997; Favrin; Jassim; Griffiths, 2001), espectrometria de massa de dessorção / ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS)(Rees; Voorhees, 2005), fago repórter geneticamente modificado (Smartt *et al.*, 2012) e ensaios imunoabsorventes ligados a enzimas (ELISAs) (Galikowska *et al.*, 2011).

1.11 BIOSSENSOR

Um biossensor ou sensor biológico é um dispositivo analítico que mede reações biológicas ou químicas gerando sinais através de um transdutor, que são proporcionais à concentração de um analito na reação (Bhalla *et al.*, 2016b; Healy *et al.*, 2007). Os biossensores apresentam basicamente três componentes (Bhalla *et al.*, 2016b; Melo *et al.*, 2018):

- Um elemento bioreceptor, usado para detectar uma molécula que reconhece especificamente o analito (ex: glicose). São exemplos de bioreceptor: organelas celulares, aptâmeros, tecido animal ou vegetal, microrganismos

como fungos, bactérias e vírus, células, enzimas, antígenos, anticorpos, fragmentos de DNA, enzimas.

- Um elemento transdutor, que irá converter uma forma de energia em outra, ou seja, converter sinais bioquímicos que ocorrem entre os analitos alvo e o biorreceptor em sinais elétricos mensuráveis. Os transdutores mais utilizados são os ópticos, piezoelétricos e eletroquímicos.
- Um elemento de detecção, por exemplo um display, que irá captar os dados obtidos pelo transdutor e interpretar em forma de gráficos ou dados numéricos que serão lidos em um hardware, que pode ser um computador ou impressora direta.

Biossensores ópticos concentraram atenção significativa durante as últimas décadas e tem sido baseado em vários princípios como refletância, transmitância, absorção, elipsometria ou fluorescência (Buerk, 2014). Eles permitir uma determinação quantitativa de uma ou mais características fundamentais da radiação óptica como amplitude, energia do fóton, fase ou polarização (Buerk, 2014).

Biossensores têm sido usados para diversas aplicações como monitoramento de doenças, descoberta de medicamentos, detecção de poluentes e de marcadores indicativos de doença nos fluidos corporais (sangue, urina, saliva, suor) e para detecção de patógenos (Bhalla *et al.*, 2016a; Melo *et al.*, 2018). Um estudo revisou o desenvolvimento e aplicação de biossensores eletroquímicos desenvolvidos para detecção de *Salmonella* e mostrou bons resultados com um tempo de detecção de até 6 minutos e baixos limites de detecção (Melo *et al.*, 2016).

A evolução no desenvolvimento de biossensores vem sendo favorecida pelo aumento da compreensão molecular e bioquímica da resposta analítica e das suas respectivas tecnologias (Melo *et al.*, 2018). Os dispositivos portáteis miniaturizados existentes permitem análises *in-situ*, apresentando uma alta sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, custo acessível, de fácil uso, com respostas rápidas e além de tudo, com limite de detecção menor do que os métodos convencionais (Bhalla *et al.*, 2016a; Kaya *et al.*, 2021).

1.12 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER COM REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (ATR-FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com reflexão total atenuada (ATR-FTIR) tem sido nos últimos tempos uma das técnicas mais poderosas para análise estrutural e reconhecimento direto espectral de materiais biológicos e suas interações (Glassford; Byrne; Kazarian, 2013; Goormaghtigh; Raussens; Ruyschaert, 1999; Tiernan; Byrne; Kazarian, 2020). Espectros de infravermelho demonstram as ligações que existem nas espécies moleculares e, portanto, nos permite “imprimir impressões digitais” (*fingerprint*) de substâncias, bem como determinar sua identidade, impurezas, qualidade e alterações (Hosseini; Jafari, 2020; Tranter, 2016). Na verdade, qualquer alteração na estrutura molecular de tecidos e materiais pode ser refletida como uma mudança na intensidade e posição das bandas de absorção nos espectros vibracionais. Portanto, o espectro de um material nos permite compreender a composição química de uma substância e como as alterações químicas podem ocorrer durante processamento (Marcott; Padalkar; Pleshko, 2017).

A espectroscopia ATR-FTIR se refere a uma classe de espectrômetros que se distinguem das unidades infravermelhas de feixe duplo mais antigas e por isso foi em grande parte substituída por vários motivos como: uso de um único feixe, possuem uma melhor resolução espectral, permitem uma coleta de dados muito mais rápida, têm uma relação sinal-ruído melhorada e por ter um detector para coletar simultaneamente um espectro em todo o comprimento de onda de interesse (Peak, 2005). Os dados brutos coletados, chamados de interferogramas, são convertidos em uma função de frequência pelo uso de um procedimento matemático chamado transformação de Fourier (Peak, 2005).

A técnica de ATR-FTIR pode ser utilizada como método analítico quantitativo e, também, como ferramenta para determinar mecanismos de ligação em sólidos e superfícies (Peak, 2005). As vibrações moleculares podem estar diretamente relacionadas com a simetria das moléculas e devido a isso, é possível determinar com precisão como uma molécula se liga às superfícies ou determinar um componente numa fase sólida a partir do seu espectro infravermelho (Peak, 2005).

As moléculas biológicas são estudadas principalmente em soluções aquosas, porém a forte absorção de água é um problema nas análises dos espectros de ATR-FTIR (Peak,

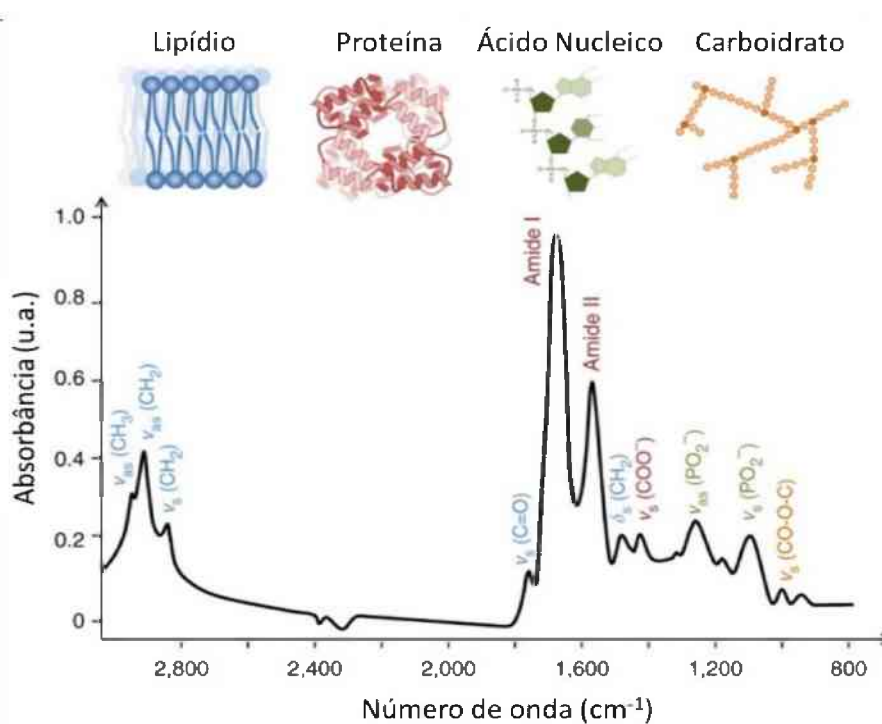
2005). Logo, o método de refletância total atenuada (ATR) é um avanço recente em FTIR, permitindo que os espectros sejam coletados na presença de água, facilitando esse efeito e fortalecendo a relação sinal-ruído (Harrick; Beckmann, 1974).

A espectroscopia ATR-FTIR se baseia em um feixe infravermelho (IR) que é refletido dentro de um elemento de reflexão interna (IRE) (que pode ser um cristal de germânio ou diamante) e a absorção pela amostra ocorre além do ponto de reflexão na chamada onda evanescente (Goormaghtigh; Raussens; Ruyschaert, 1999; Nogueira *et al.*, 2022). A diferença no índice de refração entre a amostra e os ATRs de cristal define a profundidade de penetração da onda evanescente na amostra. A luz atenuada é posteriormente devolvida ao detector (Causserand; Aimar, 2010; Lindon; Tranter; Koppelaar, 2016). De acordo com as influências dos diferentes grupos químicos, o espectro de transmitância (ou absorvância) é traçado mostrando a interação entre a amostra e a luz infravermelha em diferentes comprimentos de onda e, portanto, pode-se interpretar as ligações moleculares e grupos funcionais de amostras sólidas, líquidas e gasosas (Baker *et al.*, 2014; Goormaghtigh; Raussens; Ruyschaert, 1999). Finalmente, é obtida uma impressão digital molecular exclusiva que pode ser usada para identificar a amostra (Karoui, 2018). O ATR-FTIR é, portanto, um dos métodos mais poderosos para registrar espectros de ATR-FTIR de moléculas biológicas (Baker *et al.*, 2014; Glassford; Byrne; Kazarian, 2013; Goormaghtigh; Raussens; Ruyschaert, 1999; Tiernan; Byrne; Kazarian, 2020).

As frequências vibracionais mais significativas do IR para a maioria das moléculas varia entre 4.000 e 400 cm^{-1} (Baker *et al.*, 2014; Griffiths, 1983). Dentro desta faixa específica, existem quatro grandes regiões: (1) a região de ligação simples ($2.500\text{--}4.000\text{ cm}^{-1}$), (2) a região de ligação tripla ($2.000\text{--}2.500\text{ cm}^{-1}$), (3) a região de ligação dupla ($1.500\text{--}2.000\text{ cm}^{-1}$) e (4) a região de *fingerprint* ($600\text{--}1.500\text{ cm}^{-1}$) (Figura 2). Mais especificamente, as regiões podem ser divididas em 5 janelas espectrais distintas: A primeira janela é influenciada principalmente por grupos funcionais específicos, como ácidos graxos de membrana e certas vibrações da cadeia lateral de aminoácidos, dominadas por vibrações de alongamento de CH dos grupos funcionais CH_3 e CH_2 , que abrange a região de 3.100 a 2.850 cm^{-1} . A segunda janela, entre 1.800 e 1.500 cm^{-1} , é afetada pelos grupos amida I e amida II em proteínas e peptídeos, apresentando modos vibracionais bem definidos que fornecem informações sobre grupos funcionais presentes na estrutura da proteína, juntamente com vibrações de grupos funcionais éster em lipídios e absorções de ácidos nucleicos. A terceira janela representa uma região mista

influenciada por proteínas, ácidos graxos e compostos com grupos fosfato, afetados pelos modos de curvatura CH_2 e CH_3 , que abrange de 1.500 a 1.200 cm^{-1} . A quarta janela, de 1.200 a 900 cm^{-1} , é caracterizada por vibrações de estiramento simétrico de grupos PO_2^- em ácidos nucleicos, juntamente com vibrações relacionadas a carboidratos, polissacarídeos e ácidos nucleicos. Por último, a quinta janela, entre 900 e 700 cm^{-1} , conhecida como região verdadeira da impressão digital, demonstra padrões espectrais sutis decorrentes de vibrações de anéis aromáticos em aminoácidos e nucleotídeos específicos (Figura 2) (Baker *et al.*, 2014; Kassem *et al.*, 2023a).

Figura 2: Espectro infravermelho em amostra biológica por meio da plataforma ATR-FTIR.



Espectro de infravermelho do ATR-FTIR típico de amostras biológicas mostrando atribuições de modos vibracionais (lipídeos, proteínas, carboidratos e ácido nucleico). Azul: lipídeos; Vermelho: proteínas; Verde: ácido nucleico; e Amarelo: carboidrato.

Fonte: Adaptado de (Baker *et al.*, 2014).

Os modos vibracionais servem como identificadores para grupos funcionais em compostos orgânicos e inorgânicos, utilizando suas bandas de absorção características dentro da região infravermelha do espectro eletromagnético (El-Azazy *et al.*, 2023; Griffiths, 1983). Expressar as frequências dessas vibrações em números de onda (cm^{-1}), e fazer a comparação das posições e intensidades das bandas de absorção no espectro da

amostra com espectros de referência conhecidos, permite aos analistas determinar a presença de grupos funcionais específicos na amostra (Kassem *et al.*, 2023b).

Atualmente, ATR-FTIR é uma ferramenta de diagnóstico comercialmente acessível devido à sua miniaturização e custos razoáveis, uma vez que requer preparação mínima da amostra e nenhum descarte de produtos químicos (Nogueira *et al.*, 2022). Além disso, os métodos espectroscópicos vibracionais são procedimentos sem reagentes nos quais não há necessidade de adicionar corantes ou rótulos para medição espectral (Choo-Smith *et al.*, 2001). Além de ser um teste rápido, em comparação com procedimentos complicados como a biotipagem ou a análise do genoma, é fácil de executar, logo, parece que o ATR-FTIR está se tornando uma ferramenta importante nos estudos de identificação de microrganismos (Mariey *et al.*, 2001).

A espectroscopia ATR-FTIR representa uma ampla gama de aplicações, incluindo a análise de moléculas pequenas e complexas, bem como de células ou tecidos biológicos sendo possível fazer o mapeamento de componentes celulares (por exemplo, lipídios, carboidratos e proteínas) para detectar células anormais ou até mesmo diferenças entre as espécies (Hosseini; Jafari, 2020). O uso do ATR-FTIR acoplado à outras técnicas, incluindo algoritmos de inteligência artificial, têm sido utilizadas também na área da microbiologia para identificação, discriminação e classificação de bactérias (Mariey *et al.*, 2001; Mossoba *et al.*, 2003, 2005; Naumann, 1998; Orsini *et al.*, 2000).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biossensores baseados em ATR-FTIR e inteligência artificial com ou sem ligantes específicos a partir de colônias puras e/ou carcaças de aves.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo II

- Selecionar e caracterizar peptídeos ligantes a *Salmonella* Enteritidis usando tecnologia de *Phage Display*
- Avaliar a eficiência dos peptídeos acoplados em beads magnéticas para detecção de *Salmonella* Enteritidis a partir do ATR-FTIR suportada por algoritmos de inteligência artificial.

Capítulo III

- Desenvolver uma plataforma biofotônica sustentável a partir do ATR-FTIR, suportada por algoritmos de aprendizado de máquinas para detecção de *Salmonella* Enteritidis.

2.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASSI-GHOZZI, I. *et al.* Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia. *Pathologie-Biologie*, v. 60, n. 5, p. e49-54, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2011.07.005>

ABIEC. Associação brasileira das indústrias exportadoras de carne industrializada. *Beef Report perfil da pecuária no Brasil*. 2020. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>. Acesso em: 17 jan. 2024.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Microbiologia de alimentos para consumo humano e animal - Método horizontal para detecção, enumeração e sorotipagem de *Salmonella* - Parte 1: Detecção de *Salmonella spp.* 7 abr. 2021. ABNT. Disponível em: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/13068/abnt-nbriso6579-1-microbiologia-de-alimentos-para-consumo-humano-e-animal-metodo-horizontal-para-deteccao-enumeracao-e-sorotipagem-de-Salmonella -parte-1-deteccao-de-Salmonella -spp>. Accessed: 01/18/2024. Acesso em: 24 jan. 2024.

AGYARE, C. *et al.* Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. In: ANTIMICROBIAL RESISTANCE - A GLOBAL THREAT. *IntechOpen*, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/62553>. Acesso em: 18 jan. 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79371>

ALBAN, S. M. *et al.* Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. *PloS One*, v. 9, n. 8, p. e106222, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106222>

ANDREWS, W. H. *et al.* Bacteriological Analytical Manual (BAM) - Chapter 5: *Salmonella*. FDA, 2023. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/172194/download?attachment>.

AZEVEDO, A. P. Prevalência e características de *Salmonella spp* em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco. 2009. text - Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-04052016-172852/>. Acesso em: 12 jan. 2024.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. *Clinical Biochemistry*, v. 35, n. 6, p. 425–445, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

BACK, A. Manual de Doenças de Aves. 1. ed. Cascavel: [s. n.], 2002.

BAKER, M. J. *et al.* Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nature Protocols*, v. 9, n. 8, p. 1771–1791, 2014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

BARBAS, C. F. *et al.* Phage display: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Pr, 2001.

BAÚ, D.; SIQUEIRA, M. R.; MOOZ, E. D. *Salmonella* - Agente epidemiológico causador de infecções alimentares: uma revisão. Disponível em: http://www.xxcbcd.ufc.br/arqs/gt6/gt6_72.pdf. Acesso em: 17 fev. 2024.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology Advances*, v. 19, n. 1, p. 1–33, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00054-9)

BENNETT, A. R. *et al.* The use of bacteriophage-based systems for the separation and concentration of *Salmonella*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, n. 2, p. 259–265, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00257.x>

BESSER, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. *Food Microbiology*, v. 71, p. 55–59, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>

BHALLA, N. *et al.* Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016b. Disponível em: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/1/1/78203/Introduction-to-biosensors>. Acesso em: 11 jan. 2024. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>

BOTSARIS, G. *et al.* Detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bulk tank milk by combined phage-PCR assay: evidence that plaque number is a good

predictor of MAP. *International Journal of Food Microbiology*, v. 164, n. 1, p. 76–80, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.023>

BRASIL. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial das *Salmonella spp.* Ministério da Saúde. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-Salmonella-spp.pdf/view>. Acesso em: 01/14/2024.

BRASIL. *Salmonella* (Salmonelose). 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/Salmonella>. Acesso em: 24/01/2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2022b. Disponível em: [https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no28#:~:text=Em%202020%20foram%20confirmados%208.448,6%25\)%20por%20crit%C3%A9rio%20laboratorial](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no28#:~:text=Em%202020%20foram%20confirmados%208.448,6%25)%20por%20crit%C3%A9rio%20laboratorial). Acesso em: 3 jan. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023>. Acesso em: 02/27/2024.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Seção estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella spp.* nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, n. Normativa nº-20, de 21 de outubro de 2016, 21 out. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/inm00000020.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da SDA e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. *Diário Oficial da União*, Seção 1, n. Portaria nº 193, de 19 de Setembro de 1994, 22 set. 1994. Disponível em: <https://www.emdagro.se.gov.br/wp->

content/uploads/2020/06/PORTARIA-193-DE-19-DE-SETEMBRO-DE-1994.pdf.

Acesso em: 23 ago. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva e carne moída de bovino. *Diário Oficial da União*, n. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003, 24 nov. 2003. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-83-de-21-11-2003,666.html>. Acesso em: 3 out. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. *Fundação Nacional de Saúde*, p. 265, ago. 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19431.htm. Acesso em: 23 abr. 2020.

BUERK, D. G. *Biosensors: Theory and applications*. Crc Press, 2014. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=yThZDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=BUERK,+Donald+G.+Biosensors:+Theory+and+applications&ots=a-hhhv1Zkn&sig=oMpGTLd4BGcAFCz3t0BB04MR3Bo>. Acesso em: 12 jan. 2024.

CAUSSERAND, C.; AIMAR, P. Characterization of Filtration Membranes. *In: COMPREHENSIVE MEMBRANE SCIENCE AND ENGINEERING*. Elsevier, 2010. p. 311–335. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080932507000013>. Acesso em: 11 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-093250-7.00001-3>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC*. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>. Accessed: 01/25/2024. Acesso em: 25 jan. 2024.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC*. 2024. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>. Accessed: 01/25/2024. Acesso em: 25 jan. 2024.

CDC. National *Salmonella* Surveillance Data (Laboratory-based Enteric Disease Surveillance, LEDSS). Centers for Disease Control and Prevention. 2009. Disponível em: https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/Salmonella_annualsummarytables2009.pdf. Acesso em: 14 out. 2023.

CDC. *Salmonella*. CDC: Centers for Disease Control and Prevention., 2024b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html#:~:text=CDC%20estimates%20Salmonella%20bacteria%20cause,%2C%20fever%2C%20and%20stomach%20cramps>. Acesso em: 14 jan. 2024.

CDC. *Salmonella*. Information for Healthcare Professionals and Laboratories. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/general/technical.html>. Acesso em: 25 jan. 2024.

CHOO-SMITH, L.-P. *et al.* Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 1461–1469, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92755/>. Acesso em: 11 jan. 2024. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1461-1469.2001>

COELHO, A. A. da C. *et al.* ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA CARNE DE SOL PRODUZIDA E COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE NOVO ORIENTE/CEARÁ. *Ciência Animal*, v. 33, n. 3, p. 52 a 59–52 59, 2023. Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/11619>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DE OLIVEIRA, F. A. *et al.* Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. *Food Research International*, v. 45, n. 2, *Salmonella* in Foods: Evolution, Strategies and Challenges, p. 1000–1003, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910003728>. Acesso em: 22 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.040>

EL-AZAZY, M. *et al.* Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy - Principles and Applications. *In: INFRARED SPECTROSCOPY - PERSPECTIVES AND APPLICATIONS*. IntechOpen, 2023. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/85216>. Acesso em: 31 jan. 2024. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109139>

FAVRIN, S. J.; JASSIM, S. A.; GRIFFITHS, M. W. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation- bacteriophage assay for detection

of *Salmonella enterica* serovar enteritidis in broth. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 217–224, 2001. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.217-224.2001>

FDA. *Salmonella* (Salmonelose). FDA: Food and drug administration, 2019. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/Salmonella-salmonellosis>. Acesso em: 14 jan. 2024.

FERNANDES, S. A. *et al.* *Salmonella enterica* serotypes from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2004-2020. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 64, p. e66, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/zCfrKVgLLPyyGJtQL8tXSJj/?lang=en>. Acesso em: 1 mar. 2024. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202264066>

FERNANDES, S. A. *et al.* *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 179–184, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/wHPmNDVGxDKd4MmwKRzpYCQ/>. Acesso em: 1 mar. 2024. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000400001>

FORD, L. *et al.* Increasing Incidence of *Salmonella* in Australia, 2000-2013. *PloS One*, v. 11, n. 10, p. e0163989, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163989>

FORSYTHE, S. J. Ferramentas de gestão da segurança de alimentos. *In: MICROBIOLOGIA DA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. p. 375–389.

FOUNOU, L. L.; FOUNOU, R. C.; ESSACK, S. Y. Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1881, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>

FRANCIELE, M. C. Prevalência de infecções causadas por *Salmonella* sp. no Brasil no período de 2013 a 2017. *Journal of Infection Control*, v. 8, n. 2, 2019. Disponível em: <https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/255>. Acesso em: 12 jan. 2024.

FRANCO, B. D. G. M.; LADGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. 1ªed. São

Paulo: Atheneu, 2004.

FSIS. Foodborne Pathogen Test Kits Validated by Independent Organizations. United States Department of Agriculture., 2016. Disponível em: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-09/Validated-Test-Kit.pdf. Acesso em: 23 jan. 2024.

FSIS. Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges. United States Department of Agriculture., 2023. Disponível em: https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-4.14.pdf. Acesso em: 23 jan. 2024.

GALIKOWSKA, E. *et al.* Specific detection of *Salmonella* enterica and *Escherichia coli* strains by using ELISA with bacteriophages as recognition agents. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 9, p. 1067–1073, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1193-2>

GERMANO, P. M. L. *et al.* Prevenção e controle das infecções de origem alimentar. *Hig. aliment*, p. 6–11, 1993. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-139831>. Acesso em: 12 jan. 2024.

GLASSFORD, S. E.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1834, n. 12, p. 2849–2858, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>

GÓMARA, M. J.; HARO, I. Citrullinated peptides in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 13, n. 6, p. 743–751, 2013. <https://doi.org/10.2174/1568026611313060007>

GÓMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 5, p. 531–546, 2007. <https://doi.org/10.2174/092986707780059698>

GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; RUYSSCHAERT, J. M. Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes.

Biochimica Et Biophysica Acta, v. 1422, n. 2, p. 105–185, 1999.
[https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(99\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(99)00004-0)

GRIFFITHS, P. R. Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Science*, v. 222, n. 4621, p. 297–302, 1983. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/1691609>. Acesso em: 30 jan. 2024. <https://doi.org/10.1126/science.6623077>

GUÉRIN, P. J.; VOLD, L.; AAVITSLAND, P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: A case study in Norway. *Euro Surveillence: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, v. 10, n. 3, p. 7–8, 2005. <https://doi.org/10.2807/esm.10.03.00526-en>

HARRICK, N. J.; BECKMANN, K. H. Internal Reflection Spectroscopy. In: KANE, P. F.; LARRABEE, G. B. (org.). *Characterization of Solid Surfaces*. Boston, MA: Springer US, 1974. p. 215–245. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4490-2_11. Acesso em: 12 jan. 2024. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4490-2_11

HEALY, D. A. *et al.* Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. *Trends in Biotechnology*, v. 25, n. 3, p. 125–131, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779907000200>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.01.004>

HOSSEINI, H.; JAFARI, S. M. Chapter Eleven - Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. In: JAFARI, S. M. (org.). *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients*. Academic Press, 2020. (Nanoencapsulation in the Food Industry). v. 4, p. 347–410. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128156674000110>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>

KAROUI, R. Chapter 2 - Spectroscopic Technique: Mid-Infrared (MIR) and Fourier Transform Mid-Infrared (FT-MIR) Spectroscopies. In: SUN, D.-W. (org.). *Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)*. Academic Press, 2018. p. 23–50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128142646000025>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00002-5>

KASSEM, A. *et al.* Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in

microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1304081>. Acesso em: 30 jan. 2024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081>

KAWAZOE, U. Coccidiose. In: DOENÇAS DAS AVES. 2. ed. Campinas-SP: FACTA, 2009.

KAYA, H. O. *et al.* Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 882, p. 114989, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572665721000151>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114989>

KIM, S. *Salmonella* Serovars from Foodborne and Waterborne Diseases in Korea, 1998-2007: Total Isolates Decreasing Versus Rare Serovars Emerging. *Journal of Korean Medical Science*, v. 25, n. 12, p. 1693–1699, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2995220/>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.3346/jkms.2010.25.12.1693>

KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters*, v. 190, p. 42–50, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247817302018>. Acesso em: 18 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>

LEEDOM, L. K. R.; SPICKLER, A. R. Salmonelose. *Centro para segurança alimentar e saúde pública*, v. 1, p. 1–11, 2013. Disponível em: <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pt/Salmonella-nontyphoidal-PT.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2024.

LINDON, J. C.; TRANTER, G. E.; KOPPENAAL, D. W. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. p. 3584, 2016.

LIU, D. *et al.* A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 71, n. 2, p. 133–140, 2007. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701207002849>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.007>

LOURENÇO, M. C. S. *et al.* *Salmonella* enterica subsp houtenae serogroup O:16 in a HIV positive patient: case report. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, p. 169–170, 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/pmfT5rssqsGywDBwXLP8jfm/abstract/?lang=en>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652004000300009>

MARCOTT, C.; PADALKAR, M.; PLESHKO, N. Infrared and Raman Microscopy and Imaging of Biomaterials at the Micro and Nano Scale. *In: REFERENCE MODULE IN MATERIALS SCIENCE AND MATERIALS ENGINEERING*, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10183-3>

MARIEY, L. *et al.* Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, v. 26, n. 2, p. 151–159, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203101001138>. Acesso em: 12 jan. 2024. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00113-8)

MATHESON, N. *et al.* Ten years experiences of *Salmonella* infections in Cambridge, UK. *Journal of Infection*, v. 60, n. 1, p. 21–25, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163445309002783>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.09.016>

MEDEIROS, M. A. N. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health*, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200010>

MELO, A. M. A. *et al.* Electrochemical immunosensors for *Salmonella* detection in food. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 12, p. 5301–5312, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7548-y>

MELO, A. M. A. *et al.* Métodos Alternativos para Detecção de *Salmonella* em Alimentos. Embrapa Agroindústria Tropical, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189768/1/DOC1-28005.pdf>.

Acesso em: 28 jan. 2024.

MELO, N. S. da S. *Salmonella spp.* multidroga virulenta e resistente recuperada de carcaças de frango no Brasil. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 01, n. 04, p. 92–114, 2023. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/biologia/salmonela-spp>. Acesso em: 1 mar. 2024. <https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/biologia/salmonela-spp>

MOHAMMED, M.; THAPA, S. Evaluation of WGS-subtyping methods for epidemiological surveillance of foodborne salmonellosis. *One Health Outlook*, v. 2, p. 13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-00016-5>

MONTEIRO, E. da S. *et al.* Qualidade microbiológica de carne bovina moída comercializada em supermercados do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 12, n. 4, p. 520–530, 2018. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/467>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MORAL, M. E. G.; SIAHAAN, T. J. Conjugates of Cell Adhesion Peptides for Therapeutics and Diagnostics Against Cancer and Autoimmune Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 32, p. 3425–3443, 2017. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180118154514>

MOSSOBA, M. M. *et al.* Application of a disposable transparent filtration membrane to the infrared spectroscopic discrimination among bacterial species. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, n. 1, p. 311–314, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00114-3)

MOSSOBA, M. M. *et al.* Printing microarrays of bacteria for identification by infrared microspectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, v. 38, n. 1, A Collection of Papers Presented at the 3rd International Conference “Shedding Light on Disease: Optical Diagnostics for the New Millenium (SPEC 2004”, Newark, NJ, USA, 19-23 June 2004. Dedicated to Professor Henry Mantsch, p. 229–235, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203105000706>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.04.006>

NAUMANN, D. Infrared and NIR Raman spectroscopy in medical microbiology.

v. 3257, p. 245–257, 1998. Disponível em: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/1998SPIE.3257..245N>. Acesso em: 12 jan. 2024.

NOGUEIRA, M. S. *et al.* FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 40, p. 103036, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1572100022003222>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103036>

OMWANDHO, C.; KUBOTA, T. REVIEW *Salmonella* enterica serovar Enteritidis: a Mini-review of Contamination Routes and Limitations to Effective Control. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, v. 44, 2010. <https://doi.org/10.6090/jarq.44.7>

OPAS. PANAFETOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à mesa. Organização Pan-Americana da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com>. Acesso em: 10 fev. 2024.

ORSINI, F. *et al.* FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. *Journal of Microbiological Methods*, v. 42, n. 1, p. 17–27, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00168-8)

PEAK, D. FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. In: HILLEL, D. (org.). *Encyclopedia of Soils in the Environment*. Oxford: Elsevier, 2005. p. 80–85. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123485304001740>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/B0-12-348530-4/00174-0>

PIGATTO, C. P. Surto de *Salmonella* enteritidis/enteritidis em granja produtora de frango caipira na região sul do maranhão. 2009. <https://doi.org/10.5380/avs.v14i4.12706>

POPA, G. L.; PAPA, M. I. *Salmonella* spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*, v. 11, n. 1, p. 88–96, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8057844/>. Acesso em: 18 jan. 2024. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, v. 155, n. 7, p. 568–570, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.005>

REES, J. C.; VOORHEES, K. J. Simultaneous detection of two bacterial pathogens using bacteriophage amplification coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*, v. 19, n. 19, p. 2757–2761, 2005. <https://doi.org/10.1002/rcm.2107>

RIBEIRO, L. F.; SIMÃO, E. S.; WEBER, L. D. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium nos produtos de origem avícola e sua importância na saúde pública: uma revisão. *Revista GeTeC*, v. 11, n. 36, 2022. Disponível em: <https://revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2801>. Acesso em: 1 mar. 2024.

ROMÃO, L. J. V. Salmonelose em cortes de carne bovina no Brasil. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 02, n. 03, p. 134–142, 2023. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/salmonelose>. Acesso em: 22 jan. 2024. <https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/salmonelose>

SANTOS, H. F.; MURER, L. Salmoneloses. *In: DOENÇAS DAS AVES*. Lexington, 2018. p. 102-110.

SANTOS, M. R. L.; PEREIRA, L. J.; BIÂNGULO, T. R. CONTROLE DE QUALIDADE DE CARNE MOÍDA COMERCIALIZADA NA CIDADE DE CERES - GO. *Cientific@ - Multidisciplinary Journal*, v. 10, n. 2, p. 1–8, 2023. Disponível em: <http://periodicos.unievangelica.edu.br/index.php/cientifica/article/view/6793>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.37951/2358-260X.2023v10i2.6793>

SEIF, Y. *et al.* Systems Biology and Pangenome of *Salmonella* O-Antigens. *mBio*, v. 10, n. 4, p. e01247-19, 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.01247-19>

SHINOHARA, N. K. *S. et al.* *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 1675–1683, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/vzk44zy3zYQxMD5YN38jY4s/?lang=pt>. Acesso em: 29 jan. 2024. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)*, v. 19, n. 2, p. 405–424, 2000. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1222>

SILVA, J. A. *et al.* Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. *Hig. aliment*, p. 97–101, 2002. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-334782>. Acesso em: 12 jan. 2024.

SILVA, J. C. G. da. Incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado de pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. *Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde - UNIT - PERNAMBUCO*, v. 3, n. 1, p. 23–23, 2017. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/facipesaude/article/view/4180>. Acesso em: 15 jan. 2024.

SIVASANKAR, C. *et al.* Anti quorum sensing and anti virulence activity of tannic acid and it's potential to breach resistance in *Salmonella enterica* Typhi / Paratyphi A clinical isolates. *Microbial Pathogenesis*, v. 138, p. 103813, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103813>

SMARTT, A. E. *et al.* Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, n. 10, p. 3127–3146, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5555-5>

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, v. 228, n. 4705, p. 1315–1317, 1985. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

SOUZA, J. F. *et al.* Isolamento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* em amostras de produtos de origem animal comercializados em São Luís-Maranhão. *Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)*, v. 11, n. 6, 2023. Disponível em: <https://revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ACIS/article/view/2816>. Acesso em: 12 jan. 2024.

ŠPAČKOVÁ, M. *et al.* Typhoid fever in the Czech Republic and an imported case after return from the Rainbow Gathering in Italy. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Společnosti J.E. Purkyne*, v. 68, n. 1, p. 47–50, 2019.

TAVECHIO, A. T. *et al.* Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, p. 315–322, 1996. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rimts/a/9ZK67N8JTx6VfgPmxDDhLzc/?lang=en>. Acesso em: 1 mar. 2024. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000500001>

TIERNAN, H.; BYRNE, B.; KAZARIAN, S. G. ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 241, p. 118636, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142520306156>. Acesso em: 12 jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636>

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. *Microbiologia*. 12^aed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

TRANter, G. E. FTIR Spectroscopy of Aqueous Solutions. *In: REFERENCE MODULE IN CHEMISTRY, MOLECULAR SCIENCES AND CHEMICAL ENGINEERING*. 2016.

TRAWINSKA, B. *et al.* Evaluation of *Salmonella* rod incidence in poultry in the Lublin Province over the years 2001-2005. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, v. 15, n. 1, p. 131–134, 2008.

USDA. Serviços de Inspeção e Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. *USDA*. 2023. Disponível em: <https://www.fsis.usda.gov/inspection/compliance-guidance/microbial-risk/Salmonella>. Acesso em: 01/15/2023.

VODNIK, M. *et al.* Phage display: selecting straws instead of a needle from a haystack. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 16, n. 1, p. 790–817, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16010790>

WHO. World Health Organization. Accelerating Vaccine Development for Global Health Impact - a WHO Initiative to Prioritize Key Endemic Pathogens. Geneva. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/10-11-2023-accelerating-vaccine-development-for-global-health-impact---a-who-initiative-to-prioritize-key-endemic-pathogens>. Acesso em: 21 nov. 2023.

WHO. Expert Meeting on the pre- and post-harvest control of non-typhoidal *Salmonella* spp. in poultry meat. 2022. Disponível em: [https://www.who.int/publications/m/item/joint-fao-who-expert-meeting-on-the-pre-and-post-harvest-control-of-non-typhoidal-Salmonella -spp.-in-poultry-meat](https://www.who.int/publications/m/item/joint-fao-who-expert-meeting-on-the-pre-and-post-harvest-control-of-non-typhoidal-Salmonella-spp.-in-poultry-meat). Accessed: 11/24/2023. Acesso em: 24 nov. 2023.

WHO. World Health Organization. Multi-country outbreak of *Salmonella* Typhimurium linked to chocolate products – Europe and the United States of America. Geneva. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2022-DON369>. Acesso em: 3 nov. 2023.

WHO. *Salmonella*. World Health Organization: World Health Organization, 2023. Disponível em: [https://www.cdc.gov/Salmonella /general/index.html](https://www.cdc.gov/Salmonella/general/index.html). Accessed: 01/23/2024. Acesso em: 23 jan. 2024.

WHO. *Salmonella* (non-typhoidal). World Health Organization, 2018. Disponível em: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella -\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 23 nov. 2023.

WIBISONO, F. M. *et al.* A Review of Salmonellosis on Poultry Farms: Public Health Importance. *Systematic Reviews in Pharmacy*, v. 11, n. 9, p. 481–486, 2020. Disponível em: <https://www.sysrevpharm.org/>. Acesso em: 15 jan. 2024. <https://doi:10.31838/srp.2020.9.69>

WILLATS, W. G. T. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology*, v. 50, n. 6, p. 837–854, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1021215516430>

ZAWADZKI, F. Microbiologia veterinária aplicada. 2016.

ZERO, R. C.; RODRIGUES, J. D. O. *SALMONELLA*: RISCOS, TRANSMISSÃO E CONTROLE NA CADEIA DE PRODUÇÃO SUINA - REVISÃO DA LITERATURA. *Nucleus Animalium*, v. 9, n. 1, p. 129–141, 2017. Disponível em: <https://www.nucleus.feituverava.com.br/index.php/animalium/article/view/2692>. Acesso em: 15 jan. 2024. <https://doi.org/10.3738/21751463.2692>

3 CAPITULO II

Development of an ATR-FTIR biosensor based on magnetic nanoparticles coupled to specific Phage Display-derived peptides for the detection of *Salmonella* Enteritidis

Bruna P. do Couto ^{1,2*}, Fabiana A. A. Santos ^{1*}, Pedro L. F. Nunes ¹, Ana Flávia O. Notário ¹, Mário M. Martins¹, Flavia A. Martins ¹, Iara P. Soares¹, Phelipe A. B. M. Peres¹, Luiz Ricardo Goulart^{1,†}, Robinson Sabino- Silva ^{1,2}, Belchiolina B. Fonseca ^{1,3}.

¹ Laboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

² Graduate Program in Applied Immunology¹, and Parasitology, *Institute of Biomedical Sciences*, Federal University of Uberlândia, *Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brazil*.

³ Graduate Program in Veterinary Science, Veterinary Medicine College, Federal University of Uberlândia, *Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brazil*.

† In memoriam

* These authors contributed equally to this work (Co-first authors).

Correspondence: Belchiolina B. Fonseca, Laboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia Av. Amazonas s/n Bloco 2E sala 248, Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, 38405-302, Brazil. Email: biafonseca@ufu.br

Abstract

Salmonella Enteritidis (SE) is a zoonotic and the primary *Salmonella* serotype associated with human diseases. SE control is mandatory in Brazil and many other countries; however, its identification is time-consuming and laborious for the food industry. Our goal is to enhance SE control by developing a biosensor for detecting SE in pure colonies and/or bird carcasses. Initially, we selected SE-binding peptides using phage display technology and immobilized two (C1-2 and H1-2) on magnetic beads to identify SE. We then employed an ATR-FTIR biosensor for detection in the samples. It was shown that the detection using an ATR-FTIR biosensor combined with artificial intelligence (AI) enabled rapid identification of crucial wavenumbers for distinguish between *Salmonella* serovars. The algorithm models trained with the best predictive performance on pure colony samples were Neural Network (C1-2), Random Forest (H1-2), and SVM (*Support Vector Machine*) (anti-HM) (Rabbit anti-HM *Salmonella*). The C1-2 peptide showed the best results, demonstrating high sensitivity (100%), specificity (91.67%), and area under the curve (AUC) (99.2%) in colonies isolated from SE. For carcass samples, the best algorithm models were Tree Sorting (C1-2) and Gradient Boosting (H1-2 and anti-HM). The H1-2 peptide showed better sensitivity (88.57%), specificity (75%), and AUC (76.5%) values compared to C1-2 in carcass samples, demonstrating good potential for use in serial tests such as screening. Therefore, it could serve as an alternative to replace current standard tests.

Keywords: Phage display, magnetic beads, ATR-FTIR, artificial intelligence.

1. INTRODUCTION

The increase in the number of pathogens associated with foodborne illnesses (FADs) has posed a global threat to human health ^[1]. *Salmonella* is the primary pathogen involved in human foodborne diseases, with poultry meat being one of the primary vehicles for transmission to humans ^[2]. *Salmonella* infection in the USA is estimated at 1.35 million cases yearly, with 26,500 hospitalizations and 420 deaths ^[3]. In Brazil, the Ministry of Health reported 1,571 etiological agents causing foodborne and waterborne diseases (FADs) from 2013 to 2022, with *Salmonella spp.* as the second most common pathogen (10.9%), surpassed only by *Escherichia coli* (32.3%) ^[4].

There are 2,610 serovars within the *Salmonella enterica* species ^[5], and the *Salmonella* Enteritidis (SE) is one of the main causes of food poisoning worldwide ^[6,7]. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) has reported outbreaks of SE transmitted by poultry meat in the U.S., leading to human infections and economic losses ^[8,9]. The close relationship with broiler poultry flocks, along with public health ramifications and the scarcity of reliable commercial kits for pathogen detection, warrants further investigation to provide novel platforms for rapid identification of SE in poultry samples with improved cost-effectiveness.

Disease detection based on synthetic peptides includes the identification of pathogenic bacteria ^[10, 11]. The use of synthetic peptides offers advantages such as increased stability and the capacity for large-scale synthesis ^[12]. The application of magnetic beads for isolating, separating, and purifying these peptides has emerged as an effective approach ^[13,14]. Magnetic separation depends on paramagnetic particles that bind selectively and separate target organisms from food samples ^[15]. The use of magnetic beads as a purification method offers several advantages, including rapid procedures (minutes instead of hours), elimination of laborious pipetting or centrifugation repetitions, ease of use (elimination of columns or filters), and reduced non-specific binding due to the hydrophilic surface of the bead ^[16,17].

The gold standard for detecting *Salmonella* in food involves microbiological techniques ^[18,19], followed by serology or real-time polymerase chain reaction (PCR) for confirmation. However, these steps require several days to complete the microbiological protocol being linked with a high cost. The use of PCR, in particular, contributes to the overall expense due to the cost of reagents and equipment ^[20,21]. Hence, the search for a

quick, cost-effective, and portable diagnosis is crucial to mitigate the risk of contaminating other foods or the potential spread to other regions and countries. Alternative detection platforms have gained widespread use due to their advantages over traditional methods [21,22]. Biosensor platforms based on nanoparticles have proven to be extremely promising for bacteria detection [23]. These cutting-edge technologies offer significant advantages, providing faster, portable, sensitive, and specific platforms for detecting foodborne bacteria [24–27].

Attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a powerful technique for the direct structural and spectral recognition of samples. It can characterize molecular bonds and functional groups in biological materials. [28,29]. Currently, it stands as a commercially accessible detection tool due to its miniaturization and reasonable costs, requiring minimal sample preparation and no chemical disposal [30,31]. The high potential of using ATR-FTIR as a biosensor to detect various diseases has been well-documented in the literature [32–35]. In this context, the aim of the present study was to develop a biosensor based on ATR-FTIR spectroscopy for the detection of SE using binding peptides immobilized on magnetic beads.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of whole and lysed *Salmonella* antigen samples

The strain of *Salmonella* Enteritidis (SE) ATCC 13076 was plated on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar in the Laboratory of Infectious Diseases – UFU (LADOC-UFU) and grown at 37° C for 24 h before use. Typical colonies were then diluted in 2.5 ml of ice-cold PBS, adjusted to an optical density (OD) of approximately 0.5 (600nm). Whole SE antigen was immediately used after adjusting the OD.

Lysed SE antigens were obtained after colonies dilution in ice-cold PBS and adjusting the concentration, three successive thermal shocks were carried out in a water bath at 37°C and liquid nitrogen (2 min each). Finally, this material was sonicated five times at 4°C at an amplitude of 55 amps and cycles of 0.55, with intervals of 30 seconds on ice. Lysed SE antigens were stored at 4°C until use. We tested both intact live and lysed bacteria separately because although we focused on intact bacteria, we did not know if there would be sufficient clones for later tests.

2.2 Biopanning

Microplate 96-well, high binding (Greiner Bio one, Kremsmunster, Austria) was coated with 150 μ L of whole or lysed SE (OD 600 ~0.5) in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (NaHCO₃, pH 9.6) at 4 °C overnight. The plate was blocked for 1 h at 37 °C with phosphate-buffered saline-bovine serum albumin (PBS-BSA) (Bovogen, East Keilor, Australia) 5% and washed five times with phosphate-buffered saline plus 0.1% of Tween 20 (PBS-T 0.1%). Then, several rounds of biopanning were performed. In the first round, 10 μ L of 1×10^{11} phage particles from the Ph.D.-C7C library (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was incubated with 140 μ L of PBS per well per 1 h at 37 °C by shaking to select the phages that bind to the SE. After incubation, the plate was washed ten times with PBST 0.1% to minimize the nonspecific binding of phages. Subsequently, the first-round high-affinity phages were eluted by incubating for 10 min with 150 μ L of 0.2 M glycine (pH 2.2) at room temperature (RT) and then neutralized with 22.5 μ L of 1M Tris- HCl (pH 9.1). In the next step, the phage clones (100 μ L) were amplified using *E. coli* ER 2738 (ECR) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) as a host cell (5h at 37°C with gentle shaking). Then, it was precipitated using 20% polyethylene glycol (PEG)/2.5 M NaCl and it was suspended in PBS. Afterward, the next round (second round) was performed similarly to the first round, however, using the first round's selected phages to sensitize plaques. After the incubation, colonies infected by phage were visualized in blue and titrated in Luria-Bertani (L.B.) medium containing IPTG (200 mg/mL) and X-Gal (20 mg/mL). The subsequent round maintained the same amount of input (1×10^{11} pfu of phages) [36].

2.3 DNA extraction and sequencing

Phage DNA from clones selected after the 3rd round of biopanning were isolated from 1 ml of ECR culture in the early-log phase (OD600 ~0.03) overnight by precipitation with 1/6 volume of PEG/NaCl (20% w/w, polyethylene glycol 8000) and iodide buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA and 4 M NaI). The phage DNA was precipitated with absolute ethanol, followed by a wash with 70% ethanol, and resuspended in 20 μ L of Milli-Q water [36]. Electrophoresis was performed on a 0.8% agarose gel stained with red gel solution to verify DNA quality. Twenty-four individual clones selected were submitted to phagemid DNA sequencing, which was carried out by using the DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (G.E. Healthcare, Chicago, IL, USA) with the primer – 96 M13 (5'-CCCTCATTAGTTAGCGCGTAACG-3'), according to the

manufacturer's instructions, and detection was performed in a MegaBace 1000 Genetic Analyser (Amersham Biosciences, Slough, Buckinghamshire, U.K.) automatic capillary sequencer. Amino acid sequences were deduced according to the nucleotide sequences and analyzed using the translate tool from ExPASy-SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://web.expasy.org/translate/>).

2.4 Preparation of Salmonella serovars and microbiota of poultry for phage-ELISA

Whole SE ATCC 13076 (O:9 (D1)) and *Salmonella* Typhimurium (ST) (O:4 (B)) isolated from poultry by LADOC-UFU (confirmed by microarray PCR test Check & Trace *Salmonella* (Bio-Rad Laboratories, Inc) were seeded on Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar (OXOID®) and incubated for 24 hours at 37°C. Typical colonies were diluted in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (NaHCO₃, pH 9.6) and adjusted (OD 600 ~0.5). We used an ST strain as a control to eliminate possible cross-reactivity with this serovar.

In addition to ST, a pool containing 16 *Salmonella* serovars isolated (from poultry production or feed plants or poultry in LADOC-UFU (serotype confirmed by Check&Trace *Salmonella*) and a total microbiota of SPF (Specific Pathogen Free) poultry were tested. Clones that showed an affinity with ST and the pool of different serovars of *Salmonella* or total microbiota of SPF poultry were excluded.

The serovars contained in the Pool were: *S. Mbandara* (O:7 (C1-2)), *S. Tennessee* (O:7 (C1-2)), *S. Montevideo* (O:54), *S. Hadar* (O:8 (C2-C3)), *S. Panama* (O:9 (D1)), *S. Javiana* (O:9 (D1)), *S. Molade* (O:8 (C2-C3)), *S. Newport* (O:8 (C2-C3)), *S. Heidelberg* (O:4 (B)), *S. Ouakam* (O:9,46 (D2)), *S. Brede* (O:4 (B)), *S. Minnesota* (O:21 (L)), *S. Infantis* (O:7 (C1-2)), *S. Saintpaul* (O:4 (B)), *S. Typhimurium* 5459/11 (O:4 (B)), *S. Pullorum* (O:9 (D1)). isolated from poultry by LADOC-UFU (confirmed by microarray PCR test Check & Trace). All these serovars were isolated from poultry and grown in XLD agar. Then, the typical colonies were diluted in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (NaHCO₃, pH 9.6) and adjusted (OD 600 ~0.5) to the ELISA test.

To prepare the total microbiota, 100 grams of SPF poultry feces were diluted in distilled water (1:5) and filtered through a 120-micrometer filter paper. The filtrate was centrifugated at 7000 rpm for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was

discarded, and the pellet was resuspended in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (NaHCO₃, pH 9.6) and adjusted (OD₆₀₀ ~0.5).

2.5 Screening-Phage-ELISA

ELISA plates were coated with 50 µL/well of whole SE, ST, pool of 16 serovars of *Salmonella*, SPF poultry microbiota and wild phage (M13 phage) as a negative control in 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer (NaHCO₃, pH 9.6) at 4°C overnight. To each selected clone, we performed the test in duplicate. After washing once with PBST 0.1%, the wells were blocked for nonspecific sites with 270 µL of BSA blocking buffer, 5% in PBS, incubating for 1 h at 37 °C. After washing the wells three times, 50 µL of selected phage clones (1×10^{10} pfu/well) were added in PBST 0.1% and incubated at 37 °C for 1 h. After washing the wells five times with PBST 0.1%, we added 50 µL per well of 1:5000 HRP–anti-M13 conjugate diluted in PBST 0.1%, and incubated at 37 °C for 1 h to detect the phage clones binding to SE. Then the wells were washed six times and 50 µL of TMB substrate was added and incubated at R.T. for 5–15 min. Finally, the reaction was stopped using 20 µL of 2 M H₂SO₄ and plates were read at 492 nm using a microplate reader.

2.6 Synthesis of synthetic peptides

ELISA identified two SE-binding clones with better reactivity to SE, which differentiated SE from other serovars. These two clones, selected from whole live SE by biopanning, had their amino acid sequences used in the design for the chemical synthesis of peptides performed by GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA). Each peptide (C1-2 and H1-2) was constructed with 20 residues, containing in the C-terminal region amidation, disulfide bridge (between residues 2–10), and in the N-terminal region acetylation with 4-aa spacer (GGGS) and 6-aa part of the phage p3 (AETVES). Peptides were aliquoted in microtubes at 2mg/ml for later use and kept at -80°C.

2.7 Preparation of pure colonies of *Salmonella* spp. to develop the biosensor

Isolated strains of SE ATCC 13076, SE 1, SE 2, *S. Gallinarum* (SG) (O:9 (D1)), ST and *S. Pullorum* (SP) isolated from birds at LADOC-UFU were streaked onto nutrient agar (NA) plates. The colonies were diluted in saline until they reached turbidity corresponding to 0.5 in McFarland. scale (approximately 1.5×10^8 CFU/mL).

A total of 72 samples were prepared from pure colonies samples: [6 (strains of *Salmonella*) X 3 [2 peptides and + 1 commercial antibodies (anti-HM)] X 4

(quadruplicate)]. These samples were bound to peptide-coupled beads for analysis in AFTR later.

Commercial HM antibody (Rabbit anti-HM *Salmonella*) was used as test control. Anti-HM is one of the five commercial antibodies recommended by the WHO for differentiating SE in serum agglutination tests (gold standard) (SSI Diagnostica, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA [37]).

2.8 Contamination of poultry carcasses with *Salmonella* spp. to develop the biosensor

Three poultry carcasses (C1-2, C2 and C3) were obtained at BRF SA after dripping. We grow different serovar of *Salmonella* (SE 1, SE 2 isolated from poultry in LADOC-UFU and SE ATCC 13076), a pool of *Salmonella* spp. (ST, SG, SP and *S. Heidelberg* - SH) in NA and incubated for 24 hours at 37°C. Colonies were diluted in saline until reaching approximately 1.5×10^8 CFU/mL.

A total of 17 samples of 25g of meat from three regions of each poultry carcass (perianal, under the wing and neck) was weighed, following standard recommended by NBR ISO 6579: 2002 to detect the presence/absence of *Salmonella* in food [18]. Then, each fragment of 25g of meat was added to 222,5mL of buffered peptone water and 2,5 ml of bacterial inoculum at three concentrations (1.5×10^8 or 1.5×10^5 or 1.5×10^3 CFU/mL). So, the final concentration of bacteria in each sample was 1.5×10^6 or 1.5×10^3 or 1.5×10^1 CFU/mL. After 10 minutes at room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) to allow the inoculum to interact with the meat. A total of 2ml of fluid was removed from each sample to couple to magnetic beads immobilized with peptides C1-2, H1-2 or anti-HM as control of the test.

The rest followed the ISO 6579: 2002 protocol [18]. To evaluate whether the pre-incubation process increased the chance of detecting a low amount of SE, the samples inoculated with 1.5×10^1 CFU/mL were incubated at 37°C for 18h and tested after incubation (similar to fresh samples). In parallel, one sample of each uninoculated poultry carcass was analyzed for the detection of *Salmonella*. In summary, we tested a total of 153 samples: {[4 (3 SE strains + one pool with four serotypes of *Salmonella*) X 4 (3 dilutions + low dilution after the incubation time) X 3 (carcass) + 3 (negative control)] X 3 (2 peptides + anti-HM)}.

The carcass samples were incubated at 37°C for 18h for the isolation of *Salmonella*. Then, we took 1ml to transfer to Muller-Kauffmann Tetractin-Novobobiocin (MKTTn)

broth and 0.1ml to Rappaport-Vassiliadis Medium with Soya (RVS) broth incubated at 37°C for 24 hours. The samples were streaked on XLD and bright green (BG) agar. After the selection of typical *Salmonella spp.*, we performed the incubation in agar nutrients at 37°C/24h. After this time, following instructions from the manufacturer, the Biochemistry series was performed with the Bactray (Laborclin, Brazil).

2.9 Coupling of C1-2 and H1-2 peptides on NHS-activated magnetic beads

Following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific) with some modifications, the synthesized peptides C1-2 and H1-2 and the control anti-HM were functionalized into magnetic beads (Pierce™ NHS-activated Magnetic Beads).

Initially, 100ul of magnetic spheres were placed in 1.5 mL microcentrifuge tubes and placed on the magnetic support (Dyna Separator, Dyna, Noruega), where the spheres were collected and the supernatants discarded. A total of 200ul of wash buffer (cold 1mM hydrochloric acid) was added to each tube and gently shaken for 15 seconds. After collecting the spheres on the magnetic support and discarding the supernatant, 200ul of test solution (100ul of C1-2 or H1-2 or anti-HM at 2mg/ml and 100ul of 50mM borate, pH 8.5) were added to tubes adequately identified. After vortexing for 30 seconds, these tubes were incubated at 4°C overnight. After this time, the coupled beads were collected and 200ul of washing buffer (0.1M glycine, pH 2.0) was added to the tubes, homogenized and collected again. This washing step was performed one more time to eliminate everything that did not bound to magnetic spheres, and then 300ul of ultrapure water were added, homogenized, and the beads collected. Then, 300ul of quenching buffer (3M ethanolamine, pH 9.0) were added to the beads, vortexed and incubated on a rotator at 2h R.T. After incubation, the spheres were collected, 300ul of purified water was added. After shaking well, the beads were collected through the magnetic holder, the supernatant was discarded and 300ml of storage buffer (borate buffer with 0.05% sodium azide) was added to the tubes. After mixing well, collecting the granules and discarding the supernatant, this washing step was performed twice more. Finally, 300 ul of each tube of storage buffer was added to the pellets, mixed well and stored at 4°C until use.

2.10 Capture of *Salmonella spp.* on magnetic beads coupled to C1-2 and H1-2

Two kinds of samples from different sources of *Salmonella spp.* were tested in the beads: pure colonies samples of *Salmonella spp* extracted from NA (1.5×10^8 CFU/mL), as described in section 2.7, and fluid of contaminated poultry carcasses (1.5×10^6 or 1.5

$\times 10^3$ or 1.5×10^1 CFU/mL or inoculated with 1.5×10^1 CFU/mL after pre-incubation time), described in section 2.8.

Following the manufacturer's instructions (Thermo Scientific), with some modifications, 300ul (0.25mg) of magnetic bead coupled to C1-2, H1-2 and anti-HM (described in section 2.9) were added separately in 1.5ml microtubes (Step 1 and 2). The beads were collected in the magnetic holder, the supernatant was discarded (Step 3) and 500ul of each 1ml sample separated into sections 2.7 and 2.8 was added to a microtube and correctly identified (Step 4). Then, 20ul of bead coupled to C1-2, H1-2 and anti-HM was added separately to these microtubes with the samples and then they were incubated for 2 hours, at RT and under rotation. After that time, the spheres were collected with the magnetic support and the unbound sample was removed with washing buffer (Step 5). Finally, the spheres were diluted in 300ul of ultrapure water and stored at 4°C until use.

2.11 Spectrum Collection using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Infrared spectra were recorded on a portable ATR-FTIR spectrophotometer coupled with an attenuated total reflectance unit (Agilent Technologies, Agilent Cary 630, Santa Clara, CA, USA). A diamond disk was the crystal material in the ATR unit used as the internal reflection element. For spectral collection, 20ul of the sample were applied in a high-throughput system based on aluminum pellets, heated to 80°C in a dry bath (Ageon, Brazil) for three minutes, and added to the ATR crystal. Before each infrared analysis, the air spectrum was used as a background. The spectra were analyzed in the wavenumber region from 4000 cm^{-1} to 650 cm^{-1} and 128 scans were performed per analysis with a resolution of 4 cm^{-1} . Finally, the collected spectral data were imported into Orange 3.34.1 for analysis.

The spectra were collected from two ATR-FTIR equipment. A total of 72 pure colonies spectra were analyzed, 36 positive (SE ATCC 13076, SE 1 and SE 2) and 36 negatives (SG, ST and SP). A total of 153 spectra were collected from poultry carcass samples, 117 of which were positive (SE ATCC 13076, SE 1 and SE 2) and 45 negatives (pool of ST, SG, SP and SH).

2.12 Data analysis: multivariate and artificial intelligence

We used qualitative statistics by calculating the title mean to select the peptides.

Multivariate analyzes of the spectra generated by the ATR-FTIR were carried out using the Orange 3.34 software. The spectra were processed to obtain the best algorithm models for classifying the groups as positive and negative.

Three performance measures were calculated using the MEDCALC online platform: sensitivity, specificity, and accuracy. A receiver operator characteristic curve (ROC) was constructed with the calculation of the area under curve (AUC). For analysis, samples inoculated with SE 1, SE 2 and SE ATCC were considered positive, while serovars ST, SG, SP and SH, bacteria important for poultry production and/or poultry carcasses, were considered negative.

3. Results

3.1 Selection of phages by biopanning

The selection of peptides displayed in M13 phages that bind to SE antigens was performed using the biopanning technique. At the end of the third round, 24 SE-binding clones were selected (nine phages from whole bacteria and fifteen from the lysate). Data is not shown as it will be part of a patent.

3.2 Validation of phage clones by phage-ELISA

The ability of phages to bind with SE in its integrated and lysed form was evaluated by phage-ELISA. The ST, the microbiota of SPF poultry, and the pool with 16 serovars were used to analyze possible cross-interactions of phages, not being desirable to interact with them. Wild-type phage was used as a negative control for the reaction. Two (C1-2 and H1-2) of the twenty-four clones were selected because they show greater affinity for whole SE and lower affinity to other serovars and the microbiota (Figure 1).

3.3 Detection of *Salmonella* in pure colonies and poultry carcasses using the ATR-FTIR biosensor

In order to be able to differentiate SE from other *Salmonella* serotypes, a multivariate analysis of the data generated by the ATR-FTIR biosensor was performed on pure colonies of bacteria and also from the poultry carcasses contaminated by them.

3.3.1 FTIR mid-infrared spectra

For the average profile, the region of 650 – 4000 cm^{-1} was subjected to Gaussian smoothing, baseline correction using the Rubber Band model, and normalization with the maximum-minimum model. Figures 2 and 3 present graphs of the average spectra for the positive and negative groups of pure colonies and carcass samples, respectively.

Principal component analyzes (PCA) was performed on a total of 225 infrared (IR) spectra including peptides (C1-2, H1-2) and anti-HM antibody from the pure colonies (Figure 4) and carcass samples (Figure 5).

The region of 650 – 1800 cm^{-1} was selected for PCA from pure colonies which was treated with Gaussian smoothing, baseline correction with Rubber-band model and maximum-minimum model normalization.

Poultry carcasses with the capture made by magnetic spheres, the region of 650 – 1800 cm^{-1} was selected, which C1-2 and antibody anti-HM was treated with Gaussian smoothing, baseline correction with Rubber-band model and maximum-minimum model normalization. Peptide H1-2 was treated with Gaussian smoothing, baseline correction with linear model, maximum -minimum model normalization, performed the second derivative using the Savitzky-Golay model.

For the selected groups of *Salmonella* pure colonies (Figure 4), the results of this study indicate an explained variance of 93% for the C1-2 (Fig. 4A) and H1-2 (Fig. 4B) peptide, and 94% for the anti-HM control using the first three principal components (PCs). (Fig. 4C). The two primary components contributed most to explaining the models, where for the C1-2 peptide it was 52% (PC1-2), 33% for (PC2) (Fig. 4A), H1-2 50% (PC1-2) and 37% (PC2) (Fig. 4B), and for anti-HM 46% (PC1-2) and 35% (PC2) (Fig. 4C).

For the selected groups of *Salmonella* samples on the carcass (Figure 5), the results showed an explained variance of 88% for the C1-2 peptide (Fig. 5A), 94% for H1-2 (Fig. 5B) and 90% for the anti-HM control using the first three PCs (Fig. 5C). The two primary components contributed most to explaining the models, where for the C1-2 peptide it was 43% (PC1-2), 31% for (PC2) (Fig. 5A), H1-2 60% (PC1-2) and 26% (PC2) (Fig. 5B), and for anti-HM 42% (PC1-2) and 28% (PC2) (Fig. 5C).

The PCA algorithm used in this study generated characteristic wavelengths or vibrational frequencies for each PC of the peptides (C1-2 and H1-2) and control (anti-HM) in both pure colony and carcass samples (Supplementary Figure 1 to 6).

Further application of machine learning helped to distinguish which wavenumbers had the greatest contributions within each PC to distinguish the SE positive group from the negative group (other *Salmonella*), and certain spectral regions with high diagnostic values were identified. The wavenumbers (cm^{-1}) and potential chemical assignments of the bands referring to the biomolecular components of the C1-2, H1-2, and anti-HM carcass samples are identified in Tables 1, while in Table 2, they are for the pure colony samples

3.3.2 Artificial intelligence to select the best models

The processing of data from pure colonies and carcasses used to create artificial intelligence algorithm was carried out in the same way as in the processing of PCA, as described in section 3.3.1. The prediction models for pure colonies of the two peptides (C1-2 and H1-2) and anti-HM antibody were trained using 10-fold cross-validation. The Neural Network model demonstrated the best performance for peptide C1-2, the Random Forest model showed the best performance for peptide H1-2, and the SVM model performed the best for the anti-HM antibody (Table 3).

The spectra classification to C1-2 and H1-2 from pure colonies of *Salmonella spp.* showed high specificity, accuracy, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), positive likelihood ratio (LR+) and low negative likelihood ratio (LR-) (Table 1). The results of the biosensor immobilized with C1-2 were better than H1-2 (Table 3). Both peptides showed better results compared to commercial antibody anti-HM. Figure 6 shows the area under the curve (AUC_{ROC}) values for pure colony samples, where peptide C1-2 showed an AUC of 99.2%, H1-2 of 95.8%, and anti-HM of 96.5%.

The prediction model for ATR-FTIR data from poultry carcasses was trained with cross-validation with folds of 10 for C1-2, and the model with the best performance was Tree Sorting. For H1-2 and anti-HM, the forecast model was trained with the leave one out method, the model with the best performance was Gradient Boosting (Table 4).

The classification of spectra of poultry carcass samples, showed greater sensitivity to biosensor of H1-2 compared to C1-2 and anti-HM (Table 4). However, although the biosensor immobilized with C1-2 and H1-2 presented high specificity, the values were lower than anti-HM (Table 2). The LR+ was greater in anti-HM compared to C1-2 and H1-2 (Table IV). Figure 7 shows the area under the curve (AUC_{ROC}) values for poultry carcass samples, where peptide C1-2 showed an AUC of 76.3%, H1-2 of 76.5%, and anti-HM of 84,7%.

On the XLD and VB plates of carcass samples from test groups SE 1, SE 2, SE ATCC and poll presented the shape of the bacteria and the biochemical test confirmed the presence of *Salmonella spp.* In contrast, non-contaminated carcasses were negative for *Salmonella spp.* presence.

Discussion

The phages displaying SE-binding peptides selected showed a low binding affinity to the total microbiota or several strains of *Salmonella spp.* However, they exhibited high affinity specifically for SE.

Subsequently, highly specific SE-binding clones were identified, and from these clones, peptides named C1-2 and H1-2 were synthesized. Our study successfully selected peptides expressed in phage clones selected against SE to be potentially tested in an ATR-FTIR biosensor. In the literature, phage-based biosensors have already been used to detect bacteria [38] and good results have been found with the use of peptides expressed in bacteriophages, demonstrating high specificity for *Salmonella* [39].

Rapid *Salmonella* detection methods have become increasingly crucial for effectively monitoring food products or animals. We immobilized selected peptides (C1-2 and H1-2) and anti-HM rabbit antiserum in magnetic spheres and thus managed to capture SE present in samples of pure colonies and poultry carcasses. Magnetic separation method has already been used before rapid detection methods such as PCR, to improve the analytical sensitivity of detection of SE [40].

Detection of SE from peptide-immobilized beads was performed on a biophotonic ATR-FTIR, a promising technology for disease diagnosis [41,42]. Our strategy aimed to increase the signal for the ATR-FTIR biosensor. Thus, we could develop a portable, high-performance, and sustainable platform to differentiate SE spectra from other existing *Salmonella* samples.

The PCA model generated characteristic wavelengths for each spectrum, which are like spectral signatures, and within each spectrum, we were able to map which cellular components (lipids, carbohydrates, proteins, and nucleic acids) were most found in that sample and which were important to distinguish it from other [43,44]. Together with machine learning, we found which wave numbers had the greatest contributions within each PC and certain spectral regions with high diagnostic values were identified.

Upon analyzing the wavenumbers present in the spectra of the peptides and control, we observed that all values are below 2000 cm^{-1} . As previously reported in the literature, values below 2000 cm^{-1} are crucial and selective for differentiating bacterial species [45,46].

In this study, we identified two biomolecular components distributed among the three PCs, which were proteins and carbohydrates. These components were consistently found in pure and carcass samples, both with the peptides and anti-HM coupled. The relation between wavelengths and biomolecular compounds was determined based on a recent review study on ATR-FTIR applications in microbial cell biology [47].

Analyzing the results of this study, we realized that the regions found here of diagnostic importance are proteins and carbohydrates, which are two important components in the composition of the cell wall of Gram-negative bacteria, essentially formed by peptidoglycan (consisting of polysaccharide (carbohydrate) and peptide chains), lipid bilayer, lipoprotein, and lipopolysaccharides [48]. Thus, showing that cell wall constituents of Gram-negative bacteria are important for the differentiation of *Salmonella* serovars [49].

In detecting SE in pure culture, biosensors immobilized with C1-2, H1-2 and anti-HM presented similar high specificity. However, biosensors immobilized with C1-2 presented better results showing a sensitivity of 100% with high PPV (91,67%) and NPV (100%). So, the test does not miss to detect correctly non-SE *Salmonella* colonies. The LR+ of the biosensor of C1-2 showed that a sample identified as SE in biosensor of C1-2 has 12 times as likely to come from a really positive SE colony. Besides, LR- was zero, which is expected to be from a perfect test. The AUC of biosensor C1-2 was high (99,2%), which shows the test's potential.

Although results were a little inferior to the biosensor of C1-2, the biosensor of H1-2 showed a more significant potential with a high sensitivity, specificity, PPV, NPV, LR+ and lower LR- when compared to anti-HM (Table I). So, our results show the potential of the two peptides (C1-2 and H1-2) to identify and discriminate the SE serotype from other strains.

We did not expect both a high sensitivity and specificity result in the testes from poultry carcasses. Then our primary focus was the high sensitivity to identify fresh samples positive for SE. This approach would allow the selection of fewer samples for traditional cultivation tests using the biosensor in serial tests. The biosensor of C1-2

showed lower results compared to H1-2 and anti-HM (Table 2 and Figure 3). And although the biosensor of anti-HM showed greater specificity, the sensor of H1-2 presented greater sensitivity (Table 2). The biosensor of H1-2 showed a sensitivity of 88.55%, specificity of 75.00%, PPV of 83.78, NPV of 81.82, LH+ of 3.54, LH- of 0.15 (Table II) and AUC of 76% (Figure 3). The high sensitivity, NPV and lower LH- of the biosensor H1-2 compared to anti-HM show that biosensor H1-2 is safer for detecting negative carcasses. In this context, this biosensor based on H1-2 has the potential to be used in serial tests as a screening. However, methods to improve the quality of the sample directly from the carcass should be applied in future tests.

Compared to PCR-based methods, these are highly specific and sensitive, with a sensitivity level of 97.1%, but, in turn, they are methods that still require 24 hours of pre-application and selective enrichment steps, followed by of 2 hours of testing on food, and may have false negatives if the bacterial load is low ^[50]. Microarray technology is the gold standard in some places. It can perform simultaneous gene analysis (array PCR) and QRT-PCR (quantitative polymerase chain reaction preceded by reverse transcription), but although it has high specificity, it is expensive ^[51].

New methods to detect *Salmonella* were recently developed, including the VIDAS *Salmonella* Xpress (SLMX), an immunoassay-based test used to detect *Salmonella* in poultry meat with 26.7% of specificity and 100% of sensitivity and 81.7% of accuracy to detect SE ^[52]. We didn't reach the sensitivity expected by us in the poultry carcass. However, our test proved to have great potential.

The standard methods recommended by ISO 6579:2002 to detect the presence of *Salmonella spp* are microbiological, followed by confirmation by serology, biochemistry, or PCR ^[18]. However, in carcasses to obtain preliminary positive or negative results, these tests take 4 to 5 days and can extend up to 7 days ^[53]. After conducting the biochemical series, it is essential to perform the gold standard serotyping test known as Kauffmann-White. This method is labor-intensive, requiring substantial material consumption, and its accuracy may vary depending on the quality of the commercial and technical components involved ^[54].

Following Normative Instructions of 34/2008 and N° 20 of October 21, 2016 of the Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) in Brazil, periodic analyzes must be foreseen to ensure the absence of *Salmonella sp.* in animal carcass samples for human consumption purposes ^[55,56]. According to Programa Nacional de Sanidade Avícola

(PNISA), in Brazil is mandatory to differentiate SE and ST from other serotypes of *Salmonella* since SE and ST must be under monitoring, controlling, and vigilance in poultry farms [57]. To export poultry meat, most countries also require the control of at least these two serotypes.

We aimed to develop a rapid and low-cost test highly specific for detecting SE from *Salmonella* colonies. Initially, we tested two separate peptides for their ability to bind to three positive SE strains and three other non-SE *Salmonella* strains in quadruplicate, with excellent results. However, it is possible that the diversity among other strains could better train artificial intelligence in subsequent tests, thereby improving our results. Therefore, our focus in future trials will be achieving a specificity of at least 99.5%, surpassing that of the PCR matrices currently available on the market [58,59].

The test we developed is fast; after the peptide is immobilized on the magnetic sphere, the ATR-FTIR biosensor reads it in 2 minutes using artificial intelligence, allowing us to discriminate positive poultry carcasses for SE. Our study indicated that the detection method performed better in pure colonies than in poultry carcasses. This finding was expected and aligns with existing literature, which emphasizes that the sensitivity and specificity of methods depend significantly on the sample's microbiota, the food matrix, and the presence of inhibitory substances such as fats, proteins, polysaccharides, heavy metals, antibiotics, and organic compounds [21].

Additional tests need to be conducted to improve our index. For example, we plan to include a diverse range of *Salmonella* strains and serotypes in future tests. Furthermore, we intend to employ techniques to enhance sample purification (removing substances that interfere with test results) and prevent cross-reactions. Finally, testing both peptides in the same biosensor for pure colonies and poultry carcasses could enhance binding with positive samples, which is an interesting approach to explore.

Conclusion

We selected two peptides with high affinity for SE and coupled them to magnetic nanoparticles to develop an ATR-FTIR biosensor. The results obtained enabled the detection and differentiation of SE colonies, demonstrating high potential for utilizing the test as a screening method to identify SE on fresh bird carcasses.

Statement of Interest

The authors declare no competing financial interests.

Authors' contributions

B.P.C, F.A.A.S, A.F.O.N, B.B.F, L.R.G conceptualization; B.P.C; B.B.F sample acquisition; B.P.C, F.A.A.S, F.A.M, P.L.F.N, I.P.S, P.A.B.M.P, A.F.O.N, M.M.M performed the experiments; L.R.G, R.S-S, B.B.F resource, B.P.C, M.M.M, B.B.F wrote the paper. R.S-S edited the manuscript. All authors approved the final version.

Acknowledgments

Gratitude to Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart who led the beginning of my PhD but unfortunately due to COVID-19 could not be present to see the final work.

I would like to thank the funding agencies CAPES, FAPEMIG. and CNPQ for their financial support.

INCT in *Teranóstica e Nanobiotecnologia* (INCT-TeraNano, CNPq Process n° 403193/2022-2 e FAPEMIG Process n° CBB - APQ-03613-17).

References

1. Wang, L., Shen, X., Wang, T., Chen, P., Qi, N., Yin, B.-C., & Ye, B.-C. (2020). A lateral flow strip combined with Cas9 nickase-triggered amplification reaction for dual food-borne pathogen detection. *Biosensors & Bioelectronics*, *165*, 112364. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112364>
2. CDC. (2023). *Salmonella and Food*. Centers for Disease Control and Prevention.; 06/02/2024.
3. CDC. (2024). *Salmonella* . Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html#:~:text=CDC%20estimates%20Salmonella%20bacteria%20cause,%2C%20fever%2C%20and%20stomach%20cramps.>
4. *Brasil* (Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe-2023). (2023). Ministério da Saúde. /<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023>. Acesso em: 02/27/2024
5. OPAS. (2022). *PANAFTOSA alerta que doenças transmitidas por alimentos podem ser evitadas com ações preventivas do campo à mesa*. Organização Pan-Americana da Saúde. <https://www.paho.org/pt/noticias/7-6-2022-panaftosa-alerta-que-doencas-transmitidas-por-alimentos-podem-ser-evitadas-com>
6. Zhang, Y., Liu, K., Zhang, Z., Tian, S., Liu, X., Qi, H., Dong, D., Wang, Y., Liu, M., Li, X., Han, Y., Zhu, K., Liu, H., Yang, C., Liu, H., Du, X., Wang, Q., Wang,

H., Yang, M., ... Qiu, S. (2021). A Severe Gastroenteritis Outbreak of *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis Linked to Contaminated Egg Fried Rice, China, 2021. *Frontiers in Microbiology*, 12, 779749. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.779749>

7. USDA, *Salmonella* and Salmonellosis, Serviços de Inspeção e Segurança Alimentar do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (2023). <https://www.fsis.usda.gov/inspection/compliance-guidance/microbial-risk/Salmonella> . Acesso em: 01/15/2023

8. CDC. (2024). *Reports of Active Salmonella Outbreak Investigations*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks-active.html>

9. CDC. (2015). *Multistate Outbreak of Drug-Resistant Salmonella Enteritidis Infections Linked to Raw, Frozen, Stuffed Chicken Entrees Produced by Barber Foods (Final Update)*. <https://www.cdc.gov/Salmonella/frozen-chicken-entrees-07-15/index.html>

10. Moral, M. E. G., & Siahaan, T. J. (2017). Conjugates of Cell Adhesion Peptides for Therapeutics and Diagnostics Against Cancer and Autoimmune Diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(32), 3425–3443. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180118154514>

11. Alban, S. M., de Moura, J. F., Thomaz-Soccol, V., Sékula, S. B., Alvarenga, L. M., Mira, M. T., Olortegui, C. C., & Minozzo, J. C. (2014). Phage Display and Synthetic Peptides as Promising Biotechnological Tools for the Serological Diagnosis of Leprosy. *PLoS ONE*, 9(8), e106222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106222>

12. Gómara, M. J., & Haro, I. (2007). Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 14(5), 531–546. <https://doi.org/10.2174/092986707780059698>

13. Safarik, I., & Safarikova, M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*, 2(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>

14. Sumrall, E. T., Röhrig, C., Hupfeld, M., Selvakumar, L., Du, J., Dunne, M., Schmelcher, M., Shen, Y., & Loessner, M. J. (2020). Glycotyping and Specific Separation of *Listeria monocytogenes* with a Novel Bacteriophage Protein Tool Kit. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(13), e00612-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00612-20>

15. *Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application—Lu—2007—Angewandte Chemie International Edition—Wiley Online Library*. (n.d.). Retrieved March 8, 2024, from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.200602866>

16. BIOCLONE. (2024). *Peptide immobilization and Antibody Purification* [BIOCLONE Inc]. <http://www.bioclone.us/Peptide-conjugation-magnetic-beads-particle-resin-matrix.html>

17. Safarik, I., & Safarikova, M. (2004). Magnetic techniques for the isolation and

purification of proteins and peptides. *Biomagnetic Research and Technology*, 2, 7. <https://doi.org/10.1186/1477-044X-2-7>

18. ABNT, NBR ISO6579-1 DE 04/2021-Especifica um método horizontal para a detecção de *Salmonella*, Associação Brasileira de Normas Técnicas (2021). <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/13068/abnt-nbriso6579-1-microbiologia-de-alimentos-para-consumo-humano-e-animal-metodo-horizontal-para-deteccao-enumeracao-e-sorotipagem-de-Salmonella-parte-1-deteccao-de-Salmonella-spp>. Accessed: 01/18/2024

19. FSIS. (2023). *Isolation and Identification of Salmonella from Meat, Poultry, Pasteurized Egg, Siluriformes (Fish) Products and Carcass and Environmental Sponges*. United States Department of Agriculture. https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-4.14.pdf

20. Mohammed, M., & Thapa, S. (2020). Evaluation of WGS-subtyping methods for epidemiological surveillance of foodborne salmonellosis. *One Health Outlook*, 2, 13. <https://doi.org/10.1186/s42522-020-00016-5>

21. Melo, A. M. A., Borges, M. F., Alexandre, D. L., Furtado, R. F., Alves, C. R., & Figueiredo, E. A. T. (2018). *Métodos Alternativos para Detecção de Salmonella em Alimentos*. Embrapa Agroindústria Tropical. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189768/1/DOC1-28005.pdf>

22. FSIS. (2016). *Foodborne Pathogen Test Kits Validated by Independent Organizations*. United States Department of Agriculture. https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2020-09/Validated-Test-Kit.pdf

23. Ahmed, A., Rushworth, J. V., Hirst, N. A., & Millner, P. A. (2014). Biosensors for Whole-Cell Bacterial Detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 631–646. <https://doi.org/10.1128/CMR.00120-13>

24. Kaci, K., Enebral-Romero, E., Martínez-Periñán, E., Garrido, M., Pérez, E. M., López-Diego, D., Luna, M., González-de-Rivera, G., García-Mendiola, T., & Lorenzo, E. (2023). Multiplex Portable Biosensor for Bacteria Detection. *Biosensors*, 13(11), 958. <https://doi.org/10.3390/bios13110958>

25. Duan, N., Wu, S., Dai, S., Miao, T., Chen, J., & Wang, Z. (2015). Simultaneous detection of pathogenic bacteria using an aptamer based biosensor and dual fluorescence resonance energy transfer from quantum dots to carbon nanoparticles. *Microchimica Acta*, 182(5), 917–923. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1406-3>

26. Al-Hindi, R. R., Teklemariam, A. D., Alharbi, M. G., Alotibi, I., Azhari, S. A., Qadri, I., Alamri, T., Harakeh, S., Applegate, B. M., & Bhunia, A. K. (2022). Bacteriophage-Based Biosensors: A Platform for Detection of Foodborne Bacterial Pathogens from Food and Environment. *Biosensors*, 12(10), 905. <https://doi.org/10.3390/bios12100905>

27. Niyomdech, S., Limbut, W., Numnuam, A., Kanatharana, P., Charlermroj, R., Karoonuthaisiri, N., & Thavarungkul, P. (2018). Phage-based capacitive biosensor for *Salmonella* detection. *Talanta*, 188, 658–664. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.06.033>

28. El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., Al-Saad, K., El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., & Al-Saad, K. (2023). Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy - Principles and Applications. In *Infrared Spectroscopy—Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109139>
29. Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636>
30. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., & Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>
31. Kaya, H. O., Cetin, A. E., Azimzadeh, M., & Topkaya, S. N. (2021). Pathogen detection with electrochemical biosensors: Advantages, challenges and future perspectives. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 882, 114989. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114989>
32. Pang, W., Xing, Y., Morais, C. L. M., Lao, Q., Li, S., Qiao, Z., Li, Y., Singh, M. N., Barauna, V. G., Martin, F. L., & Zhang, Z. (2024). Serum-based ATR-FTIR spectroscopy combined with multivariate analysis for the diagnosis of pre-diabetes and diabetes. *The Analyst*, 149(2), 497–506. <https://doi.org/10.1039/d3an01519j>
33. Karas, B. Y., Sitnikova, V. E., Nosenko, T. N., Dedkov, V. G., Arsentieva, N. A., Gavrilenko, N. V., Moiseev, I. S., Totolian, A. A., Kajava, A. V., & Uspenskaya, M. V. (2023). ATR-FTIR spectrum analysis of plasma samples for rapid identification of recovered COVID-19 individuals. *Journal of Biophotonics*, 16(7), e202200166. <https://doi.org/10.1002/jbio.202200166>
34. Mateus Pereira de Souza, N., Kimberli Abeg da Rosa, D., de Moraes, C., Caeran, M., Bordin Hoffmann, M., Pozzobon Aita, E., Prochnow, L., Lya Assmann da Motta, A., Antonio Corbellini, V., & Rieger, A. (2024). Structural characterization of DNA amplicons by ATR-FTIR spectroscopy as a guide for screening metainflammatory disorders in blood plasma. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 310, 123897. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.123897>
35. Caixeta, D. C., Carneiro, M. G., Rodrigues, R., Alves, D. C. T., Goulart, L. R., Cunha, T. M., Espindola, F. S., Vitorino, R., & Sabino-Silva, R. (2023). Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 13(8), 1396. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>
36. Barbas, C. F., Burton, D. R., Scoot, J. K., & Silverman, G. J. (2001). *Phage display: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
37. Grimont, P. A. D., & Weill, F. X. (2007). *Antigenic formulae of the Salmonella serovars* (9th ed.). WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*.
38. Li, R., Li, Z., Huang, C., Ding, Y., Wang, J., & Wang, X. (2023). Phage-Based Biosensing for Rapid and Specific Detection of Staphylococcus aureus. *Microorganisms*, 11(8), 2098. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082098>

39. Morton, J., Karoonuthaisiri, N., Stewart, L. D., Oplatowska, M., Elliott, C. T., & Grant, I. R. (2013). Production and evaluation of the utility of novel phage display-derived peptide ligands to *Salmonella spp.* For magnetic separation. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(1), 271–281. <https://doi.org/10.1111/jam.12207>
40. Hyeon, J.-Y., & Deng, X. (2017). Rapid detection of *Salmonella* in raw chicken breast using real-time PCR combined with immunomagnetic separation and whole genome amplification. *Food Microbiology*, *63*, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.007>
41. Ferreira, I. C. C., Aguiar, E. M. G., Silva, A. T. F., Santos, L. L. D., Cardoso-Sousa, L., Araújo, T. G., Santos, D. W., Goulart, L. R., Sabino-Silva, R., & Maia, Y. C. P. (2020). Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Analysis of Saliva for Breast Cancer Diagnosis. *Journal of Oncology*, *2020*, 4343590. <https://doi.org/10.1155/2020/4343590>
42. Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., & Tiquia-Arashiro, S. (2023). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1304081>
43. El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., Al-Saad, K., El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., & Al-Saad, K. (2023). Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy - Principles and Applications. In *Infrared Spectroscopy—Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109139>
44. Hosseini, H., & Jafari, S. M. (2020). Chapter Eleven—Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients* (Vol. 4, pp. 347–410). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>
45. Mossoba, M. M., Al-Khalidi, S. F., Jacobson, A., Segarra Crowe, L. I., & Fry, F. S. (2003). Application of a disposable transparent filtration membrane to the infrared spectroscopic discrimination among bacterial species. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(1), 311–314. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00114-3)
46. Naumann, D. S. C., & Helm, D. (1997). What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacteria cells? *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, 279. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570854175633959296>
47. Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., & Tiquia-Arashiro, S. (2023). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1304081>
48. Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2016). *Microbiologia* (12^a). Artmed.
49. Sundaram, J., Park, B., Hinton, A. Jr., Yoon, S. C., Windham, W. R., & Lawrence, K. C. (2012). Classification and Structural Analysis of Live and Dead

Salmonella Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 991–1004. <https://doi.org/10.1021/jf204081g>

50. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety—*ScienceDirect*. (n.d.). Retrieved March 11, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514003879>

51. Ginos, M. A., Page, G. P., Michalowicz, B. S., Patel, K. J., Volker, S. E., Pambuccian, S. E., Ondrey, F. G., Adams, G. L., & Gaffney, P. M. (2004). Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, 64(1), 55–63. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2144>

52. *Salmonella* Detection in Poultry Meat – Validation of VIDAS Xpress Automatic Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay-Based Method—Chajęcka-Wierzchowska—2012—*Journal of Food Safety—Wiley Online Library*. (n.d.). Retrieved March 11, 2024, from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2012.00394.x>

53. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety—*ScienceDirect*. (n.d.). Retrieved March 11, 2024, from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713514003879>

54. Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stepień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>

55. Brazil, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 34, DE 28 DE MAIO DE 2008, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2008). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-34-de-28-de-maio-de-2008.pdf>

56. Brazil, Normativa nº-20, de 21 de outubro de 2016, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (2016). <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/inm00000020.pdf>

57. Brazil. (2023). *Salmonelas*. Ministério da Agricultura e Pecuária. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/salmonelas>

58. Koltai, H., & Weingarten-Baror, C. (2008). Specificity of DNA microarray hybridization: Characterization, effectors and approaches for data correction. *Nucleic Acids Research*, 36(7), 2395–2405. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn087>

59. Yoshida, C., Gurnik, S., Ahmad, A., Blimkie, T., Murphy, S. A., Kropinski, A. M., & Nash, J. H. E. (2016). Evaluation of Molecular Methods for Identification of

Salmonella Serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(8), 1992–1998.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00262-16>

TABLES

Table I: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with biomolecular components frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating *Salmonella* serovars in carcass.

C1-2 peptide

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 3	1579	N-H bending	Protein
PC 2	1636	C=C stretching	Protein
PC 2	1743	Carboxylic acids C=O stretching	Protein
PC 1	1058	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1092	C-H bending	Carbohydrates
PC2	1019	C-H bending	Carbohydrates
PC2	1020	C-H bending	Carbohydrates
PC1	1034	C-H bending	Carbohydrates

H1-2 peptide

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 3	1579	N-H bending	Protein
PC 3	1590	N-H bending	Protein
PC 3	1519	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 1	1743	Carboxylic acids C=O stretching	Protein
PC 3	1741	Carboxylic acids C=O stretching	Protein
PC 3	1745	Carboxylic acids C=O stretching	Protein

PC 1	1020	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1159	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1036	C-H bending	Carbohydrates

Anti-HM

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 1	1539	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 2	1541	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 3	1744	Carboxylic acids C=O stretching	Protein
PC 1	1020	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1036	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1071	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1101	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1160	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1054	C-H bending	Carbohydrates

Table II: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with biomolecular components frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating *Salmonella* serovars in pure colonies

C1-2 peptide

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 1	1632	N-H bending	Protein
PC 3	1636	N-H bending	Protein
PC3	1511	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 2	1743	Carboxylic acids C=O stretching	Protein
PC 1	1020	C-H bending	Carbohydrates

PC 2	1035	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1161	C-H bending	Carbohydrates

H1-2 peptide

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 1	1662	C=O stretching	Protein
PC 3	1657	C=O stretching	Protein
PC 2	1637	N-H bending	Protein
PC 2	1207	Aliphatic C-N stretching	Protein
PC3	1506	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 1	1060	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1058	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1069	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1388	C-H bending	Carbohydrates

Anti-HM

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC 1	1653	N-H bending	Protein
PC 1	1560	N-H bending	Protein
PC 2	1256	C-N stretching	Protein
PC3	1512	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 1	1052	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1176	C-H bending	Carbohydrates
PC 1	1061	C-H bending	Carbohydrates
PC 2	1159	C-H bending	Carbohydrates

Table III: Sensitivity, specificity and precision values of granules coupled with C1-2 and H1-2 peptide, and antibody anti-HM after artificial intelligence analysis of data obtained from pure colonies of the ATR-FTIR biosensor.

	C1-2		H1-2		Anti-HM	
	Neural network		Random Forest		SVM	
	Value	95% ci	Value	95% ci	Value	95% ci
Sensitivity	100%	71.51 – 100%	91.67 %	61.52- 99.79%	83.33%	51.59- 97.91%
Specificity	91.67%	61.52- 99.79%	91.67 %	61.52- 99.79%	91.67%	61.52- 99.79%
PPV	91.67%	62.75 – 98.63	91.67 %	61.52- 99.79%	90.91%	60.09- 98.52%
NPV	100%		91.67 %	61.52- 99.79%	84.62%	60.64- 95.17%
LR+	12	1.84- 78.37	11	1.67- 72.40	10	1.51- 66.43
LR -	0		0.09	0.01- 0.60	0.18	0.05- 0.65
Accuracy	95.65%	78.05 - 99.89%	91.67%	73.00- 98.97%	87.50%	67.64- 97.34%

PPV: Positive predictive value. NPV: negative predictive value. LR+: Positive likelihood ratio. LR-: Negative likelihood ratio

Table IV: Sensitivity, specificity and precision values of granules coupled with C1-2 and H1-2 peptide, and antibody anti-HM after artificial intelligence analysis of data obtained from poultry carcasses of the ATR-FTIR biosensor.

	C1-2		H1-2		Anti-HM	
	Tree Sorting		Gradient Boosting		Gradient Boosting	
	Value	95% ci	Value	95% ci	Value	95% ci
Sensitivity	73,53%	55,64- 87,12%	88,57 %	73,26- 96,80%	77,78%	57,74- 91,38%
Specificity	70,83%	48,91- 87,38%	75 %	53,29- 90,23%	87,50%	67,64- 97,34%
PPV	78,12%	64,97- 71,40%	83,78 %	71,89- 91,26%	87,50%	70,44- 95,36%
NPV	65,38%	50,49- 77,7%	81,82 %	63,49%	77,78%	62,97- 87,81%
LR+	2,52	1,31- 4,85	3,54	1,75- 7,16	6,22	2,12- 18,28
LR -	0,37	0,20- 0,69	0,15	0,06- 0,39	0,25	0,12- 0,52
Accuracy	72,41%	59,10 - 83,34%	83,05%	71,03- 91,56%	82,35%	69,13- 91,60%

PPV: Positive predictive value. NPV: negative predictive value. LR+: Positive likelihood ratio.

LR-: Negative likelihood ratio.

FIGURES

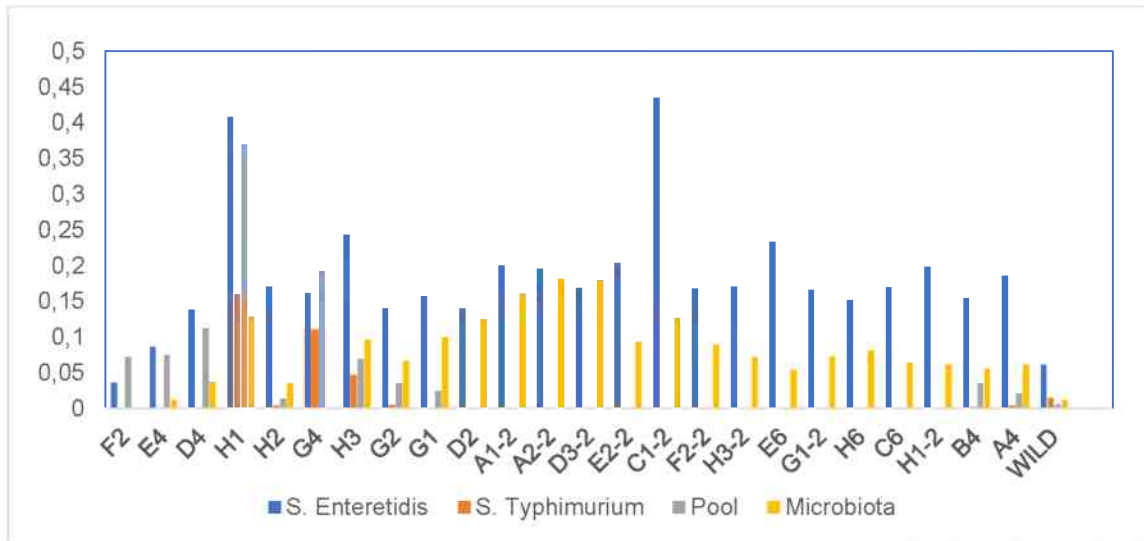


Figure 1: Mean of absorbance from Phage-ELISA testing of the twenty-four *Salmonella* Enteritidis (SE)-biding clones (X-axis) selected in biopanning to SE (blue), ST (orange), pool of *Salmonella* (gray) and total of microbiota of SPF birds (yellow). Optical density (O.D.) was measured at a wavelength of 492 nm (Y-axis).

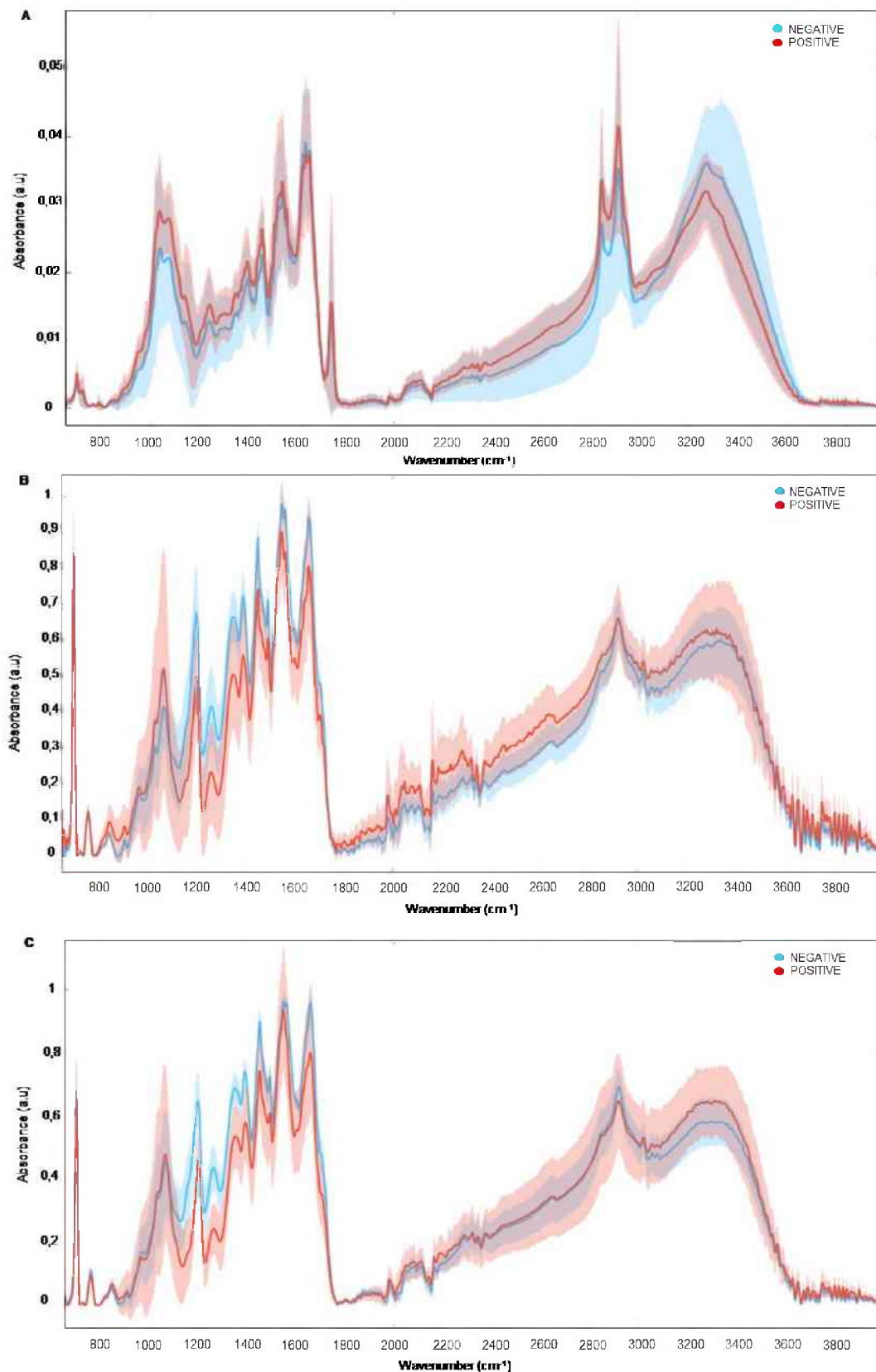


Figure 2: The average spectral profile of pure colonies of the C1-2 (A), H1-2 (B), and anti-HM (C) peptide is shown. In red are the averages of the IR spectra for the positive group (SE), and in blue are the averages for the negative groups (SG, ST, SP).

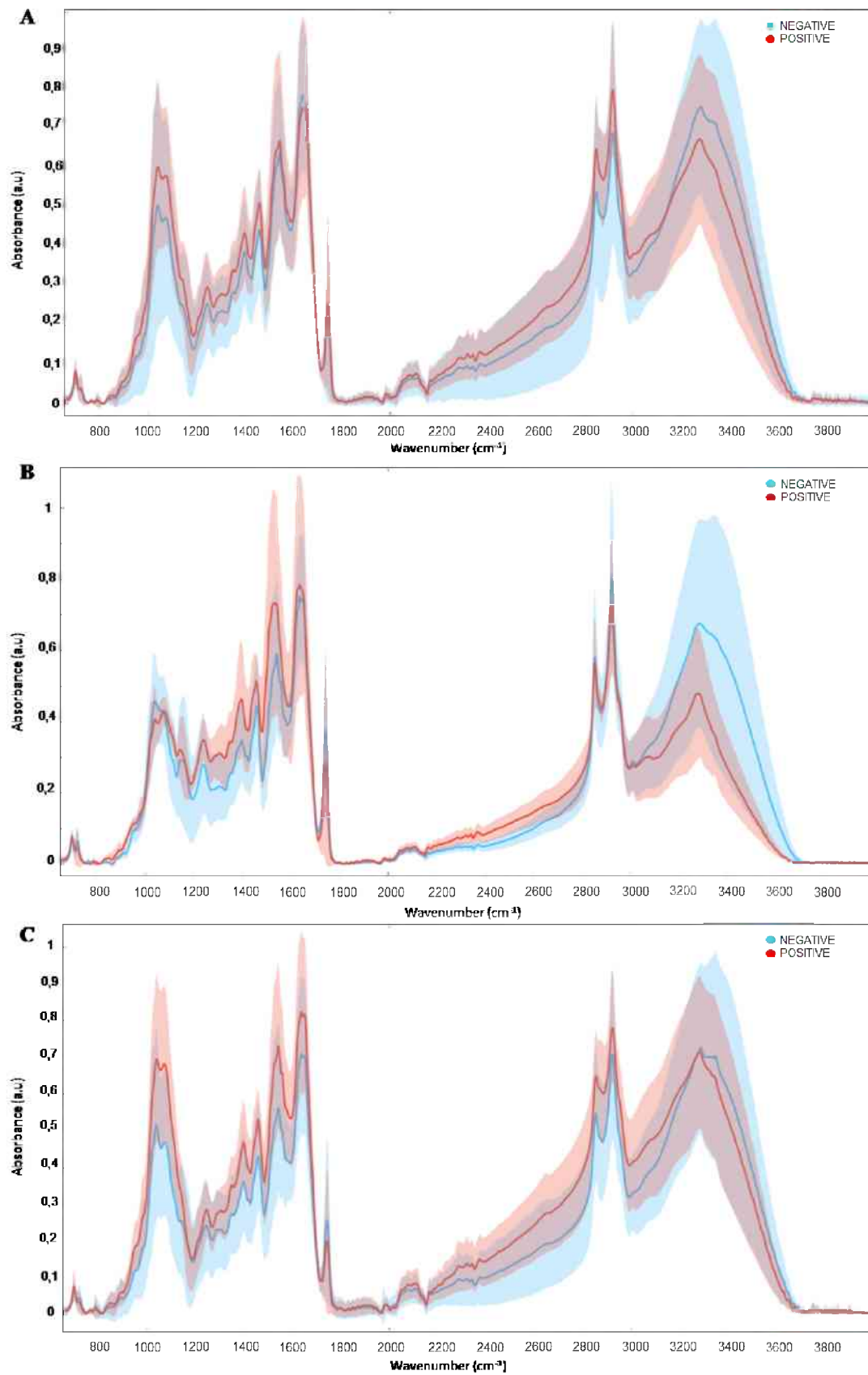


Figure 3: The average spectral profile of poultry carcasses of the C1-2 (A), H1-2 (B), and anti-HM (C) peptide is shown. In red are the averages of the IR spectra for the positive group (SE), and in blue are the averages for the negative groups (pool of ST, SG, SP, SH).

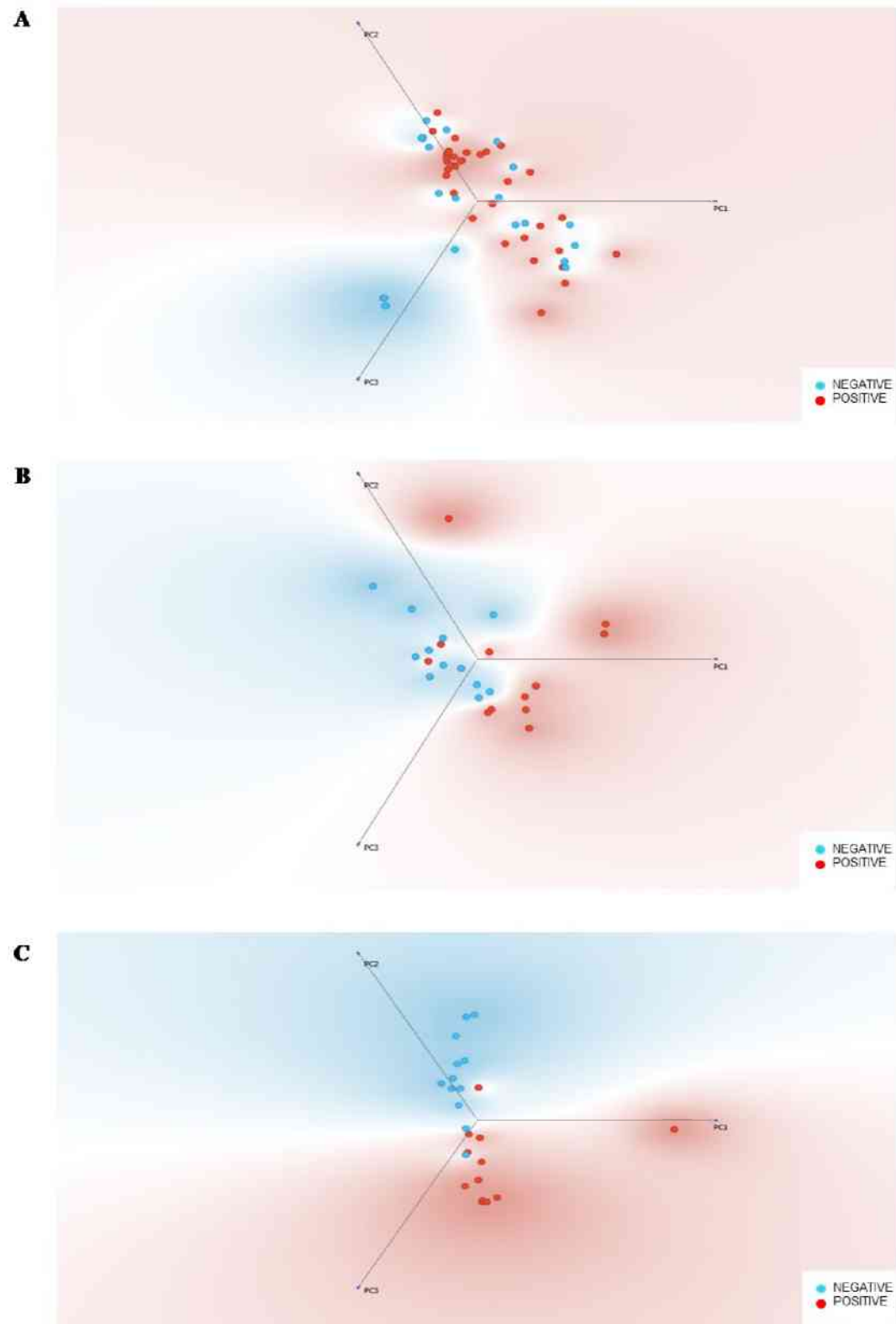


Figure 4: Principal component analysis (PCA) graphs for pure colonies of peptides C1-2 (A), H1-2 (B), and anti-HM (C) are presented. Positive samples (SE) are represented in red and negative samples (SG, ST, SP) are represented in blue.

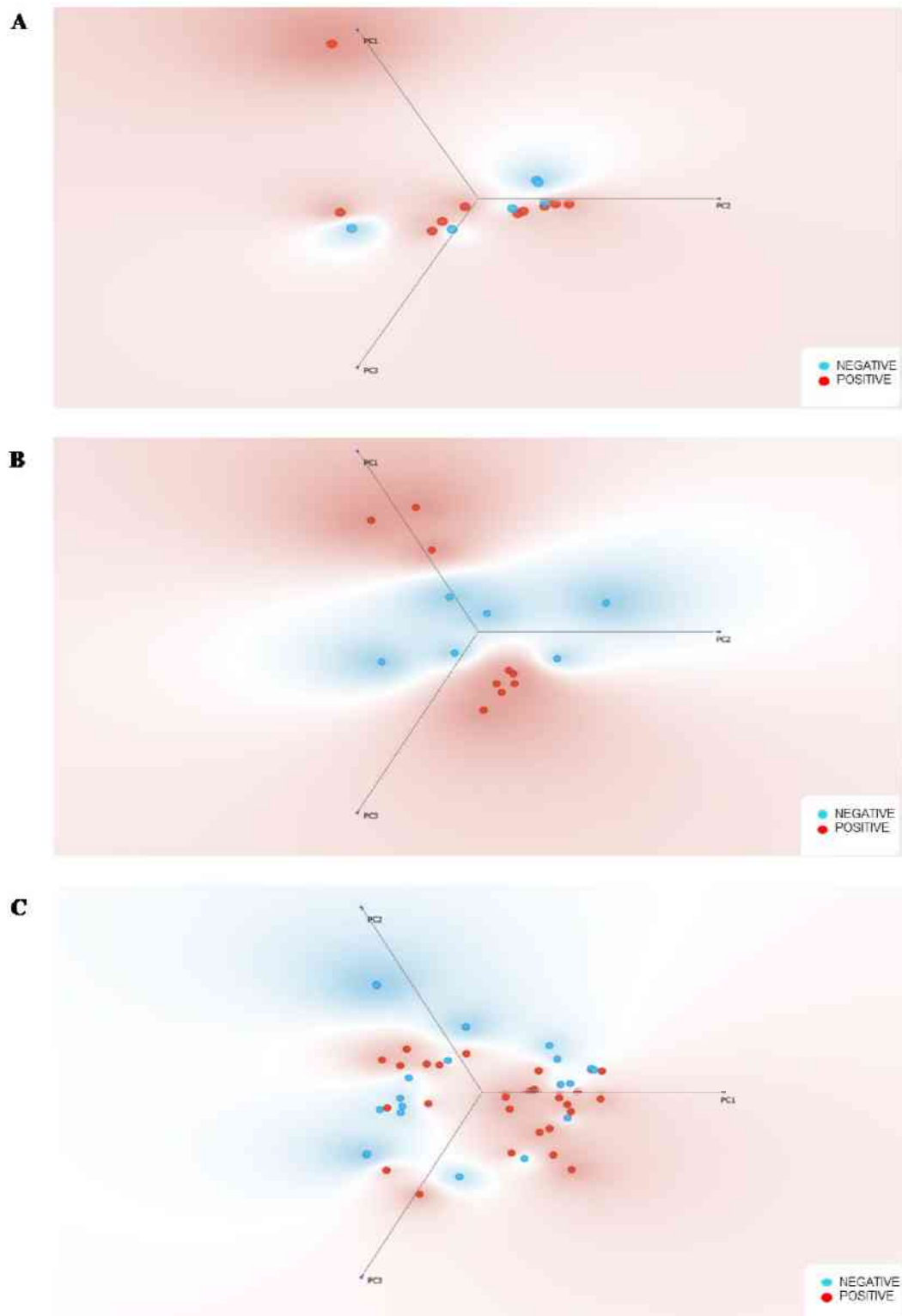


Figure 5: Principal component analysis (PCA) plots are presented for the poultry carcasses of the C1-2 (A), H1-2 (B), and anti-HM (C) peptides. Positive samples (SE) are represented in red and negative samples (pool of ST, SG, SP, SH) are represented in blue.

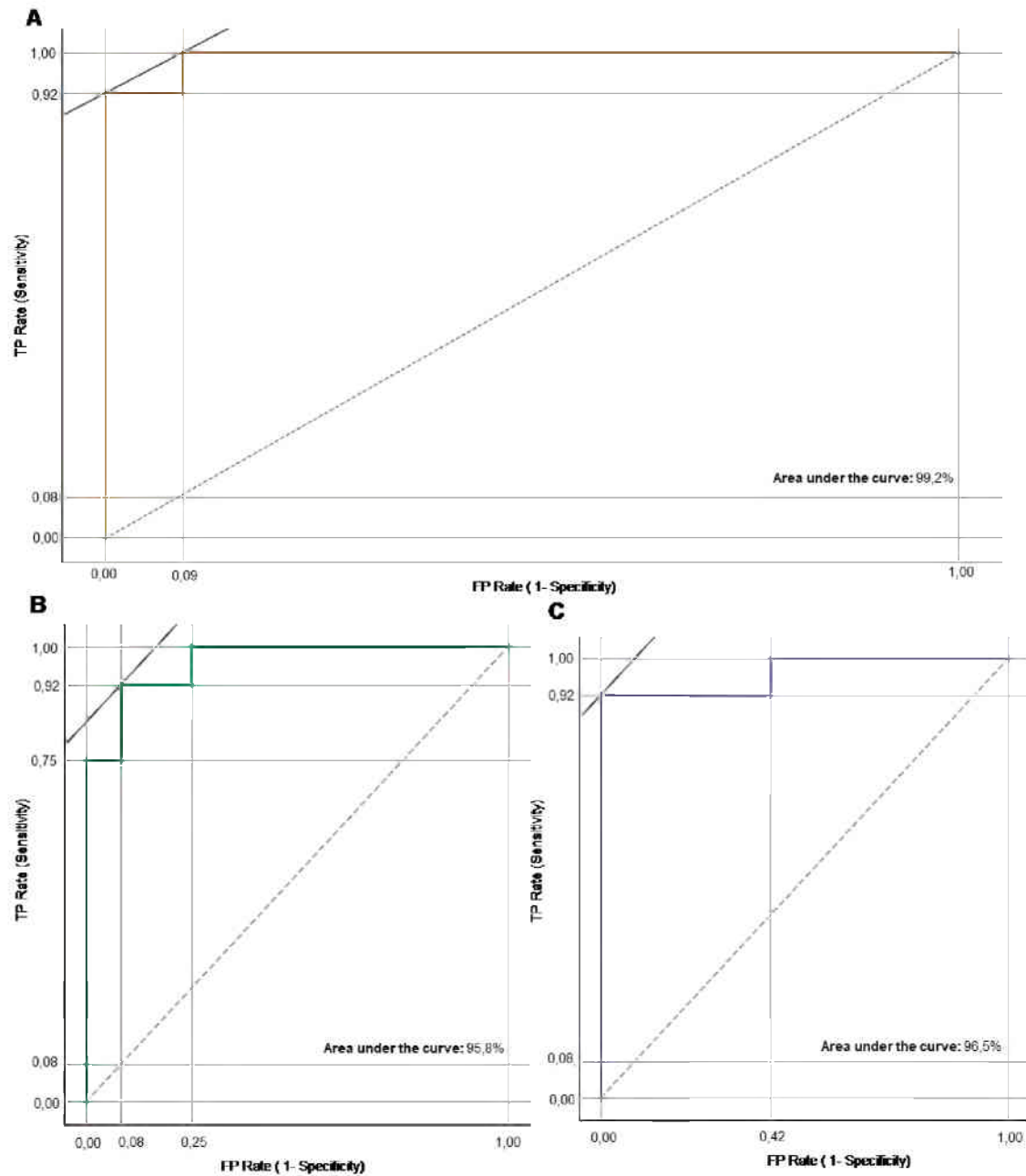


Figure 6: The area under the curve (AUC_{ROC}) values: A) C1-2 peptide, B) H1-2 peptide, and C) anti-HM antibody after artificial intelligence analysis of data obtained from pure colonies of the ATR-FTIR biosensor.

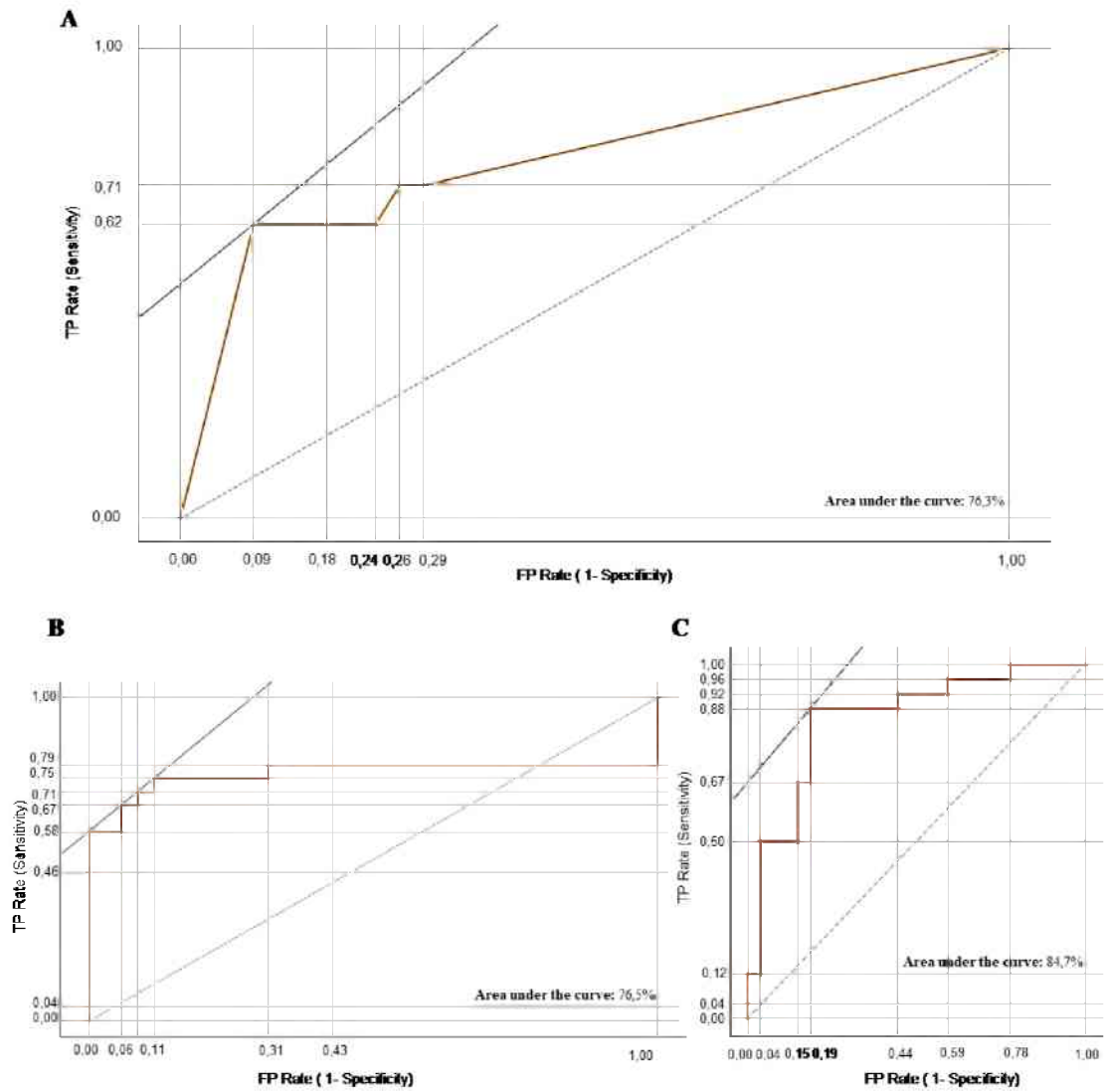
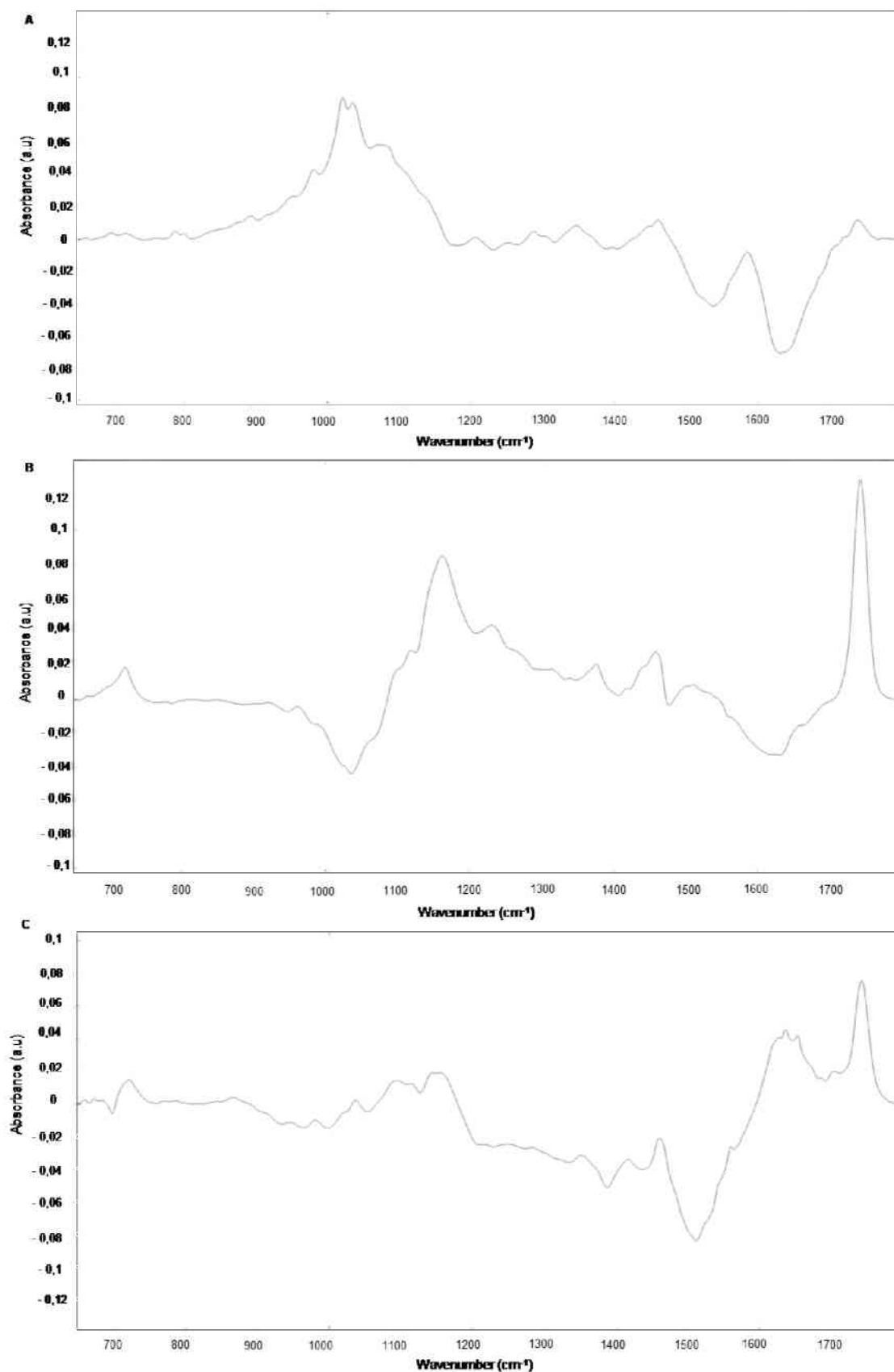
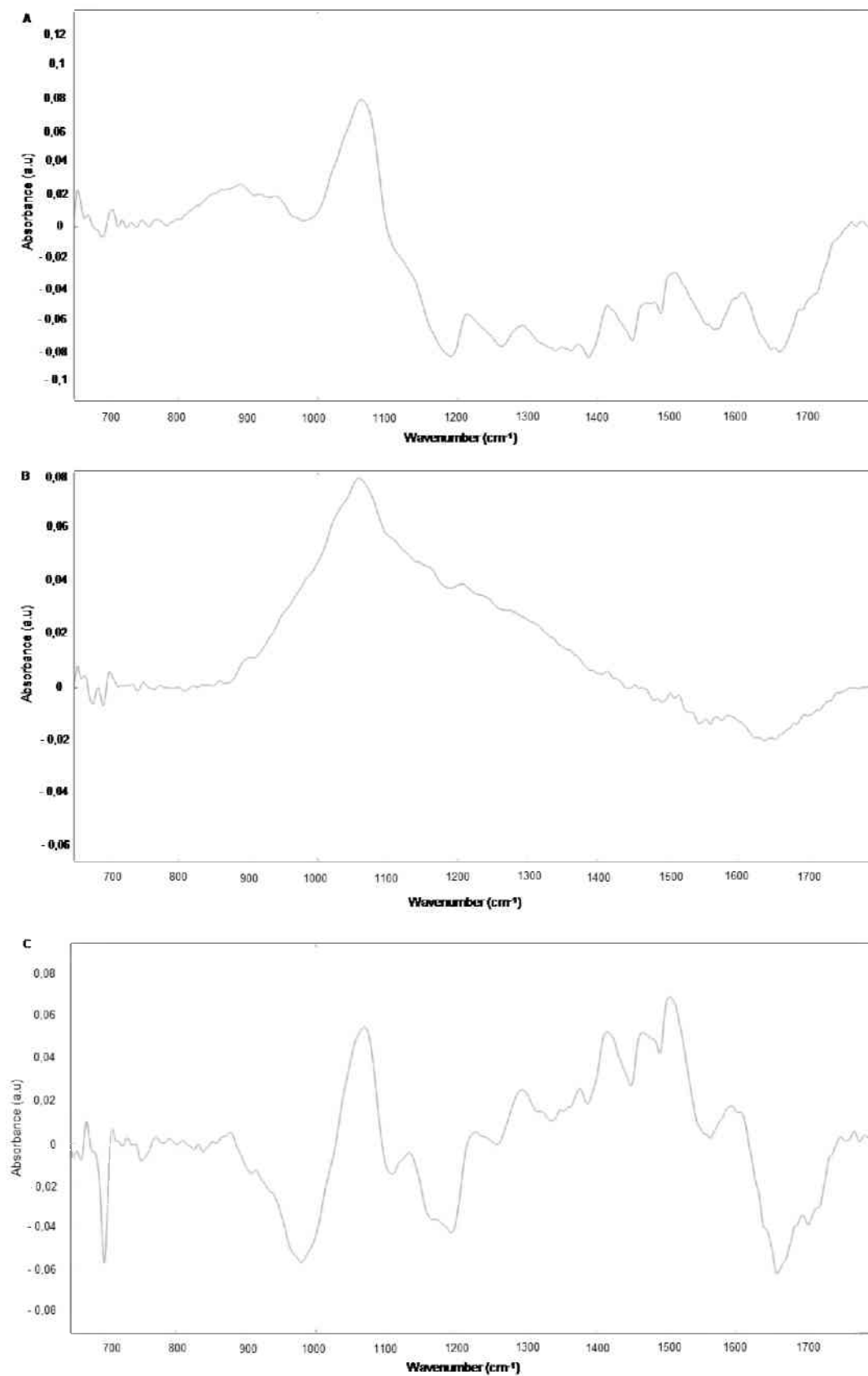


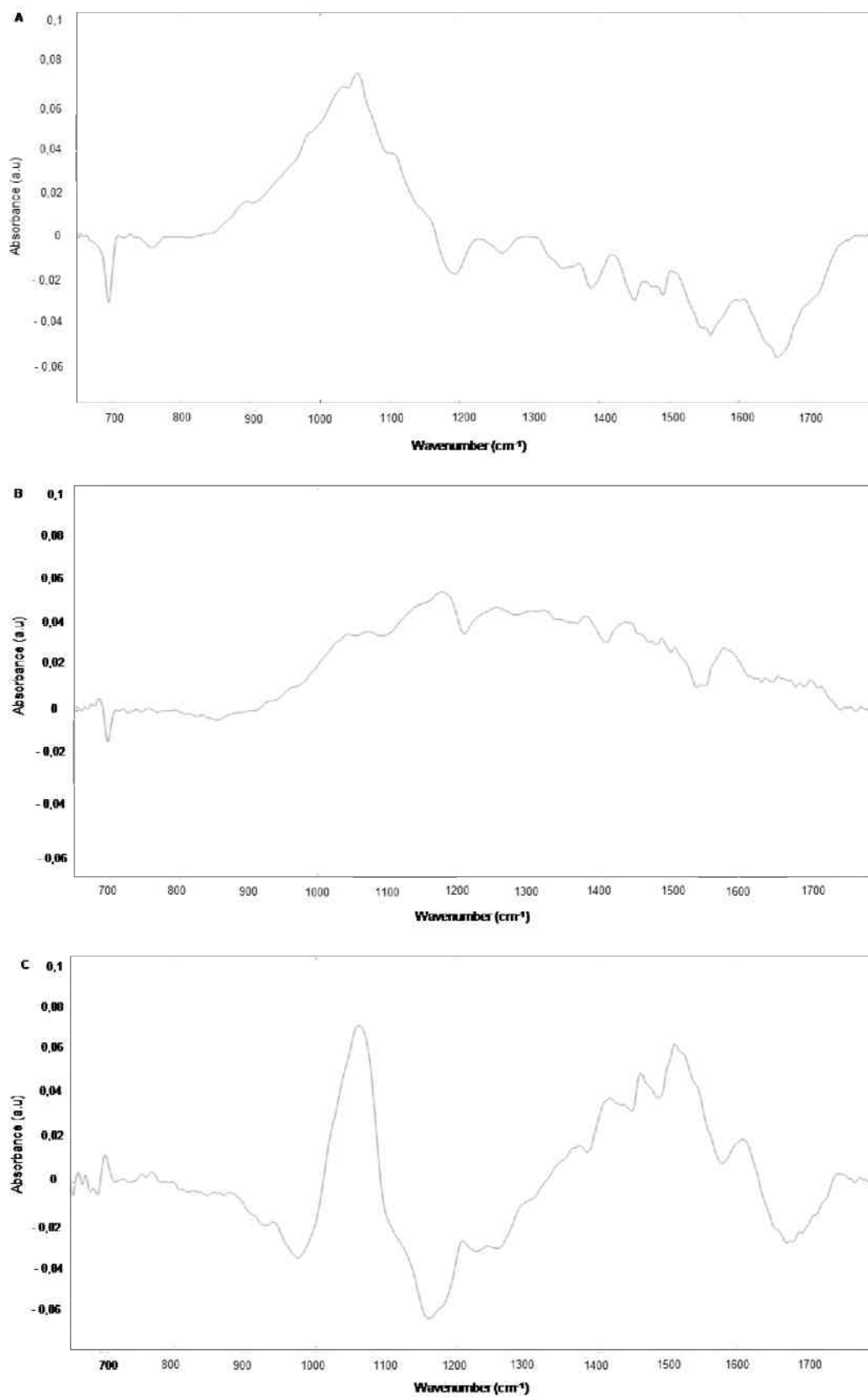
Figure 7: The area under the curve (AUC_{ROC}) values: A) C1-2 peptide, B) H1-2 peptide and C) anti-HM antibody after artificial intelligence analysis of data obtained from poultry carcasses of the ATR-FTIR biosensor.



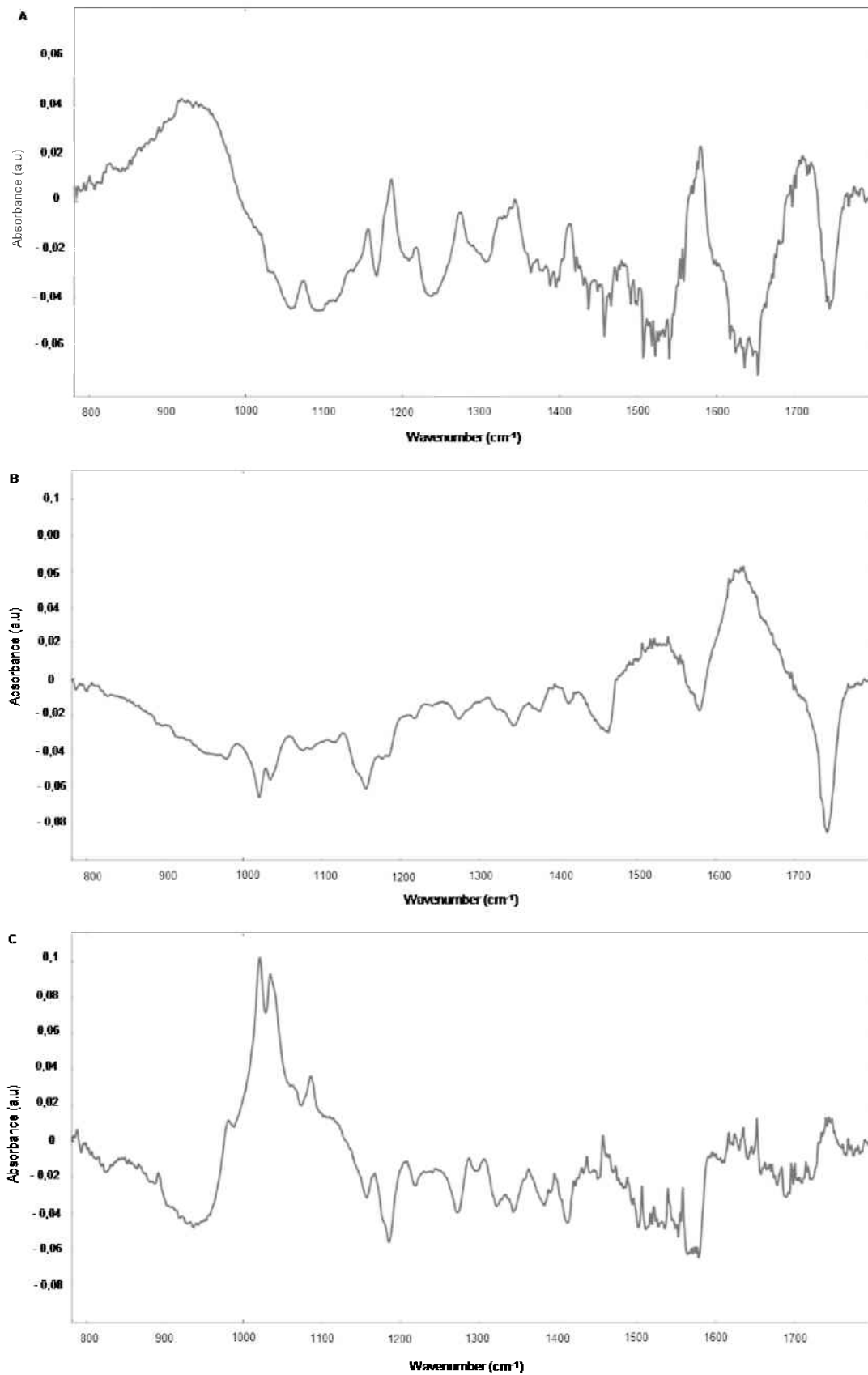
Supplementary Figure 1: The wavenumber of greatest contribution for the C1-2 peptide in pure colony samples is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).



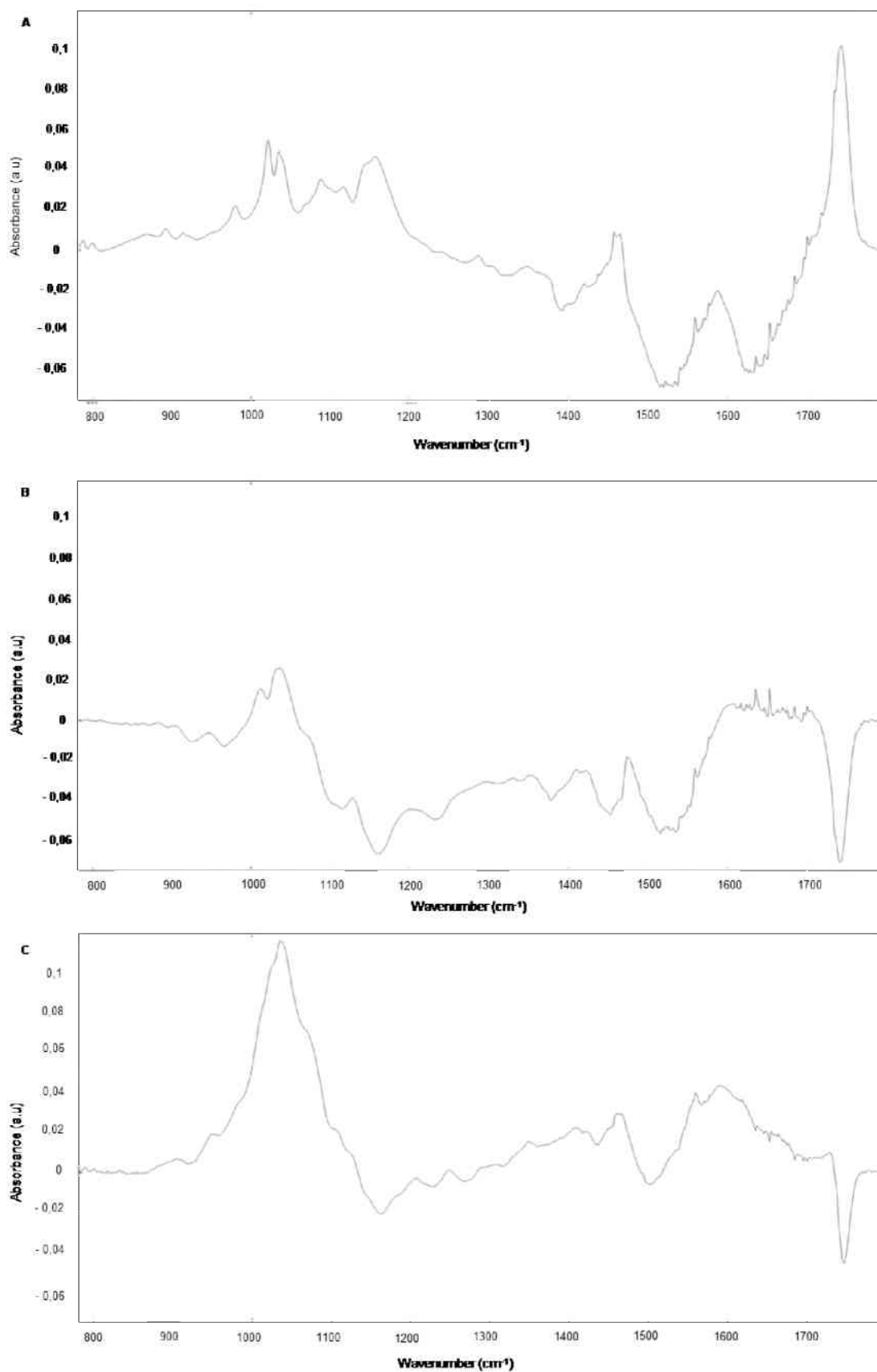
Supplementary Figure 2: The wavenumber of greatest contribution for the H1-2 peptide in pure colony samples is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).



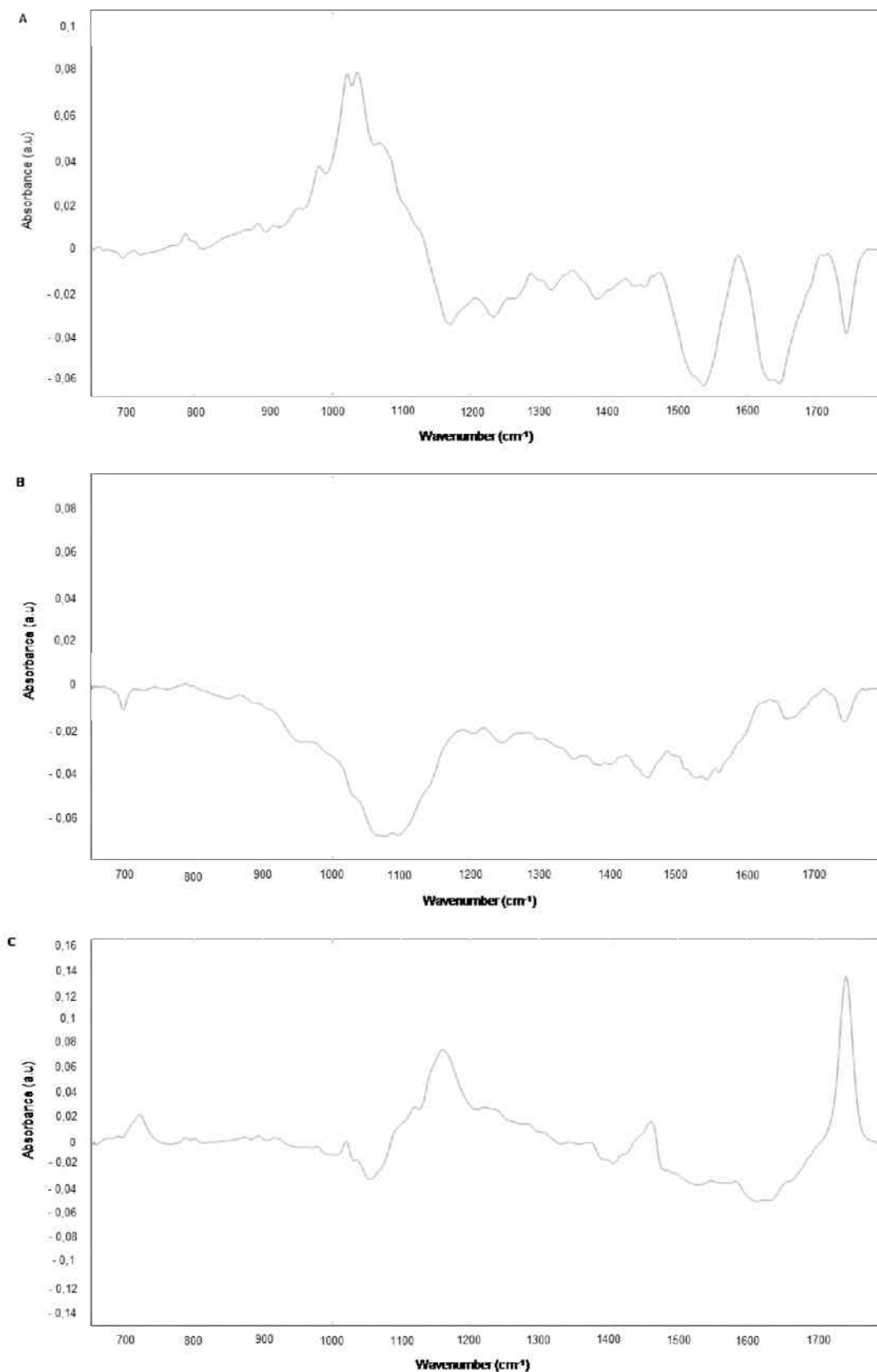
Supplementary Figure 3: The wavenumber of greatest contribution for the anti-HM in pure colony samples is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).



Supplementary Figure 4: The wavenumber showing the greatest contribution for the C1-2 peptide in poultry carcasses is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).



Supplementary Figure 5: The wavenumber showing the greatest contribution for the H1-2 peptide in poultry carcasses is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).



Supplementary Figure 6: The wavenumber showing the greatest contribution for the anti-HM antibody in poultry carcasses is represented by the first three principal components, PC1-2 (A), PC2 (B), and PC3 (C).

4 **CAPÍTULO III**

Is it possible to identify *Salmonella* Enteritidis using *attenuated total reflection (ATR)-Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy* associated with artificial intelligence (AI)?

Bruna P. do Couto ^{1,2*}, Mário M. Martins^{1*}, Fabiana A. A. Santos ¹, Arlene Bispo dos Santos Nossol¹, Luiz Ricardo Goulart^{1,†}, Robinson Sabino- Silva ^{1,2}, Belchiolina B. Fonseca ^{1,3}.

¹ Laboratory of Nanobiotechnology Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

² Graduate Program in Applied Immunology, and Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brazil.

³ Graduate Program in Veterinary Science, Veterinary Medicine College, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 38400-902, Brazil.

† In memoriam

* These authors contributed equally to this work (Co-first authors).

E-mail addresses: biafonseca@ufu.br (Belchiolina B. Fonseca).

ABSTRACT

Salmonella is a primary pathogen responsible for foodborne illnesses. In this study, we combined attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) with artificial intelligence (AI) to detect *Salmonella* Enteritidis (SE). Infrared (IR) spectra were recorded from the five *Salmonella* serotypes [SE, *S. Gallinarum* (SG), *S. Typhimurium* (ST), *S. Heidelberg* (SH), and *S. Dublin* (SD)], and the data were divided randomly across training data (158 samples) and external validation data (118 samples) for the construction of the *Salmonella* database. The trained algorithm models with the best predictive performance were Random Forest, Support Vector Machine (SVM), and Logistic Regression. All models achieved a high accuracy value of 97.46%. Considering a good diagnostic test as one that presents the best values of sensitivity, specificity, and area under the curve, the Random Forest (94.74%, 97.98%, and 99.7% respectively) and SVM (94.74%, 97.98%, and 99.6% respectively) models were deemed by this study as the best for distinguishing SE from other *Salmonella* serovars. Our study revealed that the combination of ATR-FTIR and machine learning, demonstrating good results and being fast, economical, and applicable *in situ*, holds great potential for use in *Salmonella* diagnosis.

Keywords: ATR-FTIR, artificial intelligence, diagnostic, *Salmonella* Enteritidis.

1. Introduction

Salmonella is a gram-negative bacterium that spread widely throughout nature, contaminating meat, raw and undercooked foods, leading to salmonellosis or gastroenteritis (WHO, 2023). Data from the CDC in the United States estimates that *Salmonella* causes approximately 1.35 million illnesses, resulting in 26,500 hospitalizations and 420 deaths (CDC, 2024). Despite substantial underreporting of the disease in the country, data from the Brazilian Ministry of Health reveal that from 2013 to 2022, *Salmonella* was one of the most identified etiological agents in outbreaks of Waterborne and Foodborne Diseases, representing 10.9% of total cases (Brazil, 2023).

While the World Health Organization continually evaluates and discusses control measures in the broiler production chain (WHO, 2022), zoonotic and foodborne outbreaks caused by *Salmonella* are reported globally (CDC, 2024). Among the five main *Salmonella* serovars involved in human infections in general, *S. Enteritidis* (SE) appears first with 54.6% of cases, followed by *S. Typhimurium* with (ST) 11.4% (EFSA, 2022).

The rates of infections resulting from the consumption of food contaminated by this genus remain high and Brazil plays an important role in this scenario as it is the largest exporter of meat to the world. To mitigate the risk of infection from food, the pursuit of a quick, affordable, and *in situ* diagnosis for detecting *Salmonella* becomes an important strategy for controlling the disease. Biosensor-based methods have shown great promise and are considered a favorable approach for enhancing *Salmonella* detection (Shen *et al.*, 2021; Zambry *et al.*, 2022).

Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) has emerged as one of the most powerful techniques for structural analysis and the direct spectral recognition of biological materials and their interactions (Glassford *et al.*, 2013;

Goormaghtigh *et al.*, 1999; Tiernan *et al.*, 2020). ATR-FTIR spectroscopy is sensitive, and fast (compared to complicated procedures such as biotyping or genome analysis), and it does not require the use of reagents, offering a relatively low cost of processing with sustainability (Butler *et al.*, 2019; Caixeta *et al.*, 2020; Mariey *et al.*, 2001a; Severcan *et al.*, 2010; Theophilou *et al.*, 2016).

Although different *Salmonella* serotypes can cause diseases with different degrees of pathogenicity, differentiating these serotypes can be expensive, time-consuming, and/or laborious. In this sense, the differentiation of SE is mandatory since it is the most pathogenic zoonotic *Salmonella* for humans. Then, alternative methods for identifying SE distinguishing this serovar from others more commonly associated with foodborne human disease is important (Shinohara *et al.*, 2008). ATR-FTIR technology is also available in portable devices, and samples do not require extensive preparation, making it ideal for field use to prevent outbreaks caused by contamination. Therefore, the present study aims to demonstrate the potential of ATR-FTIR spectroscopy combined with AI strategies to distinguish SE from other *Salmonella* serovars.

2. Materials and methods

2.1 *Salmonella* spp. strains and sample preparation

Samples of strains of *Salmonella* spp. isolated from chicken at the Infectious Diseases Laboratory - UFU (LADOC-UFU) were well characterized and confirmed by commercial microarray PCR test Check & Trace *Salmonella* (Bio-Rad Laboratories, Inc). A total of two strains of SE, one strain of *S. Gallinarum* (SG), two strains of ST (ST), one strain of *S. Heidelberg* (SH), and one strain of *S. Dublin* (SD) were tested. These strains were cultured on universal nutrient medium LB (Luria Broth - KASVI) for 18-24 hours at 37°C.

Three LB agar plates were prepared for each of the serovars (for ST and SE, two strains were used to streak 3 plates each). Next, three different 1.5 ml microtubes were properly labeled, and colonies were collected from the plates using a sterile loop. The collected colonies were then diluted in MilliQ water, and the absorbance (OD) was measured in a spectrophotometer at 600nm until reaching an OD of 2.9. Samples from each microtube were read in triplicates, and this process was carried out on two different days. Samples whose OD was greater than 2.9 were not used ensuring a minimum of sixty readings per bacterium to analyze for potential errors or noise in the two pieces of equipment used. After the analysis, excluding data from noisy sample readings, a total of 276 *Salmonella* samples were obtained, including 53 SE samples, 55 SG samples, 55 SH samples, 57 ST samples, and 56 SD samples.

2.2 Collection of infrared spectra

The ATR-FTIR analyzes were carried out at the Laboratory of Nanobiotechnology prof. doctor Luiz Ricardo Gourlart. ATR-FTIR analyses, SE samples were considered positive, while SG, ST, SH, and SD samples were considered negative. Portable ATR-FTIR spectrophotometer coupled with an attenuated total reflectance unit (Agilent Technologies, Agilent Cary 630, Santa Clara, CA, USA) was used to read the samples on two different days and with two separate pieces of equipment.

This approach ensured that the multivariate analysis models considered potential sources of variance in the sampling procedure. The internal reflection element in the ATR unit was a diamond disk. For the collection of infrared spectra, 2 microliters of samples were directly applied to the crystal and allowed to dry before measuring the absorbance. Before each infrared analysis, the air spectrum was used as a background. The spectra were analyzed in the wavenumber region from 4000- 650 cm^{-1} , with 32 scans performed

per analysis at a resolution of 2 cm^{-1} . The spectrum was recorded by absorbance, and the data were subsequently imported into Orange 3.34.1 for analysis. A total of 276 spectra, encompassing all five *Salmonella* serovars (as explained in section 2.1), were collected using two ATR-FTIR equipment to build a database.

2.3 Data segregation for use in Artificial Intelligence (AI).

The datasets are randomly divided into two parts: training data and testing data. Training data is utilized to train the machine learning models, enabling them to predict test results. External validation data, or test data, is then employed to accurately and efficiently assess the performance of the trained algorithm (Uçar *et al.*, 2020). The dataset acquired in this study was randomly divided into 158 samples for the training data and 118 samples for the external validation data. In the training data, 124 negative samples (28.3% ST, 27.4% SD, 25% SH, 19.3% SG) and 34 positive samples were randomly separated. In the external validation data, there were 19 positive samples (100%) and 99 negative samples (31.3% SG, 24.3% SH, 22.2% ST, 22.2% SD). The spectra generated from these sets were then utilized in Artificial Intelligence analysis.

2.4 Multivariate analyzes

Multivariate analyses of the spectra generated by the ATR-FTIR were conducted using Orange 3.34 software. The spectra were processed to obtain the best algorithm models for classifying the groups as positive and negative. Three performance measures sensitivity, specificity, and accuracy were calculated using the MEDCALC online platform. For analysis, samples of SE were considered positive, and the other samples were considered negative

3. Results and discussion

3.1 ATR-FTIR spectra

Infrared spectra reveal the bonds present in molecular species, thereby providing 'fingerprints' of substances (Hosseini & Jafari, 2020a; Tranter, 2016). The region of 4000 - 650 cm^{-1} was subjected to Gaussian smoothing, baseline correction using the Rubber Band model, and normalization with the maximum-minimum model. Figure 1 displays the graphs of the average spectra for the positive and negative groups from both the training (Figure 1A) and external validation (Figure 1B) data.

3.2 Principal Component Analysis (PCA)

As an unsupervised model for database construction, principal component analysis (PCA) was conducted. PCA graphs assess the degree of sample grouping by projecting data into linear subspaces and detecting infrared spectral changes (Mariey *et al.*, 2001b). Each spectrum is compared to others, facilitating the differentiation of SE from other *Salmonella* serovars (negative samples).

PCA was performed on the 158 IR spectra from the training data and 118 spectra from the external validation data, representing the five different *Salmonella* serovars (Figure 2). The results of this study indicate an explained variance of 100% for the training data (Figure 2A) and an achieved variance of 100% for the external validation data (Figure 2B) using the first five principal components (PCs). Our results align with the literature, where FTIR technology successfully detected and differentiated *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* between live and dead cells using the PCA model (Sundaram *et al.*, 2012).

The two primary components, PC1-2 (53.99%) and PC2 (24.57%), explained 78.56% of the cumulative variance explained in the training data (Figure 2A). In the

external validation data, PC1-2 (60.28%) and PC2 (18.61%) collectively explained 78.89% of the cumulative variance (Figure 2B).

The IR vibrational frequencies in ATR-FTIR technology serve as spectral signatures, containing valuable information about the characteristic chemical composition of each *Salmonella* serovar. This technology is capable of mapping cellular components, including lipids, carbohydrates, proteins, and nucleic acids (El-Azazy *et al.*, 2023; Hosseini & Jafari, 2020b).

The PCA algorithm used in this study generated characteristic wavelengths or vibrational frequencies for each PC in the training and external validation data (Supplementary Figure 1). Further application of machine learning helped to distinguish which wavenumbers had the greatest contributions within each PC to distinguish the SE positive group from the negative group (other *Salmonella*), and certain spectral regions with high diagnostic values were identified. The wavenumber (cm^{-1}) and potential chemical assignments of bands referring to biomolecular components for the external validation and training data are identified in Tables 1 and 2, respectively. Wavenumbers below 2000 cm^{-1} , including 1020 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} , 1037 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} , and 1055 cm^{-1} identified here were well-documented in the literature as crucial and selective for differentiating between different species of bacteria (Mossoba *et al.*, 2003; Naumann & Helm, 1997).

The present study identified three functional groups derived from lipids, proteins, and carbohydrates distributed within PCs, and these components were found consistently in both external validation and training data. The vibrational modes at 3395 cm^{-1} , 3292 cm^{-1} , 3368 cm^{-1} , 2922 cm^{-1} were responsible for characterizing lipids, while 1050 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} , 1037 cm^{-1} , 1036 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} , 1055 cm^{-1} were responsible for differentiating carbohydrates and 627 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1515 cm^{-1} ,

1540 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} , 1624 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} , 1657 cm^{-1} , 1659 cm^{-1} , 1545 cm^{-1} were responsible for differentiating proteins. The correlation between wavelengths and biomolecular compounds was determined based on a recent review study on ATR-FTIR applications in microbial cell biology (Kassem *et al.*, 2023a).

Analyzing the results, we realized that three molecular components found in this study are predominantly present in the composition of the cell wall of Gram-negative bacteria – essentially formed by peptidoglycan (consisting of polysaccharide (carbohydrate) and peptide chains), lipid bilayer, lipoprotein (lipids and proteins), and lipopolysaccharides (lipids and polysaccharides) (Tortora *et al.*, 2016). We thus realized that the three molecular components identified in this study are found predominantly in the cell wall of Gram-negative bacteria. Thus, showing that the constituents of the cell wall of Gram-negative bacteria are important for the differentiation of *Salmonella* serovars (Sundaram *et al.*, 2012).

3.3 Artificial intelligence to select the best models

To create the artificial intelligence algorithm, the absorbance data of the samples were processed by selecting the region of 4000-650 cm^{-1} and applying Gaussian smoothing, baseline correction with the Rubber Band model, and normalization using the maximum-minimum model. The prediction models were trained with 10-fold cross-validation, and the three best models underwent external validation. Supplementary Figure 2 displays their predictive performance.

For the Random Forest modeling, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 4) of the external validation data were 94.74%, 97.98%, 97.46% and 99.7% respectively. For the support vector machine (SVM) model, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under

the curve (AUC) (Figure 3) of the external validation data were 94.74%, 97.98%, 97.46% and 99,6%, respectively. For the Logistic Regression model, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 3) of the external validation data were 100%, 96.97%, 97.46% and 98,1% respectively.

The gold standard method for monitoring *Salmonella* contamination in food is the conventional microbiological method standardized by the International Organization for Standardization (ISO) (ISO 6579:2002) (ABNT, 2021) followed by serological or molecular methods for identification. The conventional method is laborious and time-consuming, as results can only be confirmed within two to seven days, posing challenges when testing a large number of samples (Lee *et al.*, 2015). The ELISA test is the most commonly used serological test, but it is laborious (Ren *et al.*, 2022), and the use of monoclonal/polyclonal antibodies and enzymes can be disadvantageous due to cost. (Wang *et al.*, 2014). The multiplex qPCR assay and microarray PCR are commonly used for screening *Salmonella spp*, exhibiting a sensitivity and specificity of 100%. (Delgado *et al.*, 2024; Heymans *et al.*, 2018). However, it is a complex test that involves intricate processing and necessitates sophisticated equipment and skilled operators, rendering it an expensive method (Brosel-Oliu *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017).

Our results achieved very high sensitivity, specificity, and accuracy; however, they are still inferior to PCR. It is important to highlight that we tested only 5 serotypes in our study. By expanding our spectral library to include a greater variety of samples and serotypes, we anticipate achieving satisfactory results. Therefore, in the future, we expect that the ATR-FTIR biosensor, aided by AI algorithms, will be capable of effectively identifying viable bacteria (Sundaram *et al.*, 2012) as potential sources of contamination in the food industry.

The use of AI has proven to be a promising tool, and the application of the SVM algorithm, as demonstrated in this study, has shown effectiveness in classifying groups into positive and negative (Chen *et al.*, 2021). Other techniques that rely heavily on visual interpretation often face reproducibility challenges, as judgments are required to decide whether a faint band is a band or an artifact, or whether there is sufficient bacterial growth in a well or not (Foley *et al.*, 2007).

The ATR-FTIR method developed in this study is a promising tool for use as a commercially accessible diagnostic due to its miniaturization (can be taken to the field), shorter operational time (about 2 minutes for reading), reasonable costs (requires minimal sample preparation), and no disposal of chemicals or need to add dyes for spectral measurements (Choo-Smith *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2022).

4. Conclusion

In conclusion, our study suggests that the ATR-FTIR platform coupled with artificial intelligence holds significant potential for *Salmonella* diagnosis. It not only yields good results and is user-friendly but also is portable for field use, improving current detection methods in the food industry. Therefore, this sustainable technique could reduce test costs, sample volume, and time to result, enabling the possibility of conducting multiple tests.

Acknowledgments

Gratitude to Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart who led the beginning of my PhD but unfortunately due to COVID-19 could not be present to see the final work.

I would like to thank the funding agencies CAPES, FAPEMIG and CNPQ for their financial support.

INCT in *Teranóstica e Nanobiotecnologia* (INCT-TeraNano, CNPq Process nº 403193/2022-2 e FAPEMIG Process nº CBB - APQ-03613-17).

REFERENCES

ABNT, NBR ISO6579-1 DE 04/2021-Especifica um método horizontal para a detecção de *Salmonella*., Associação Brasileira de Normas Técnicas (2021). <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/13068/abnt-nbriso6579-1-microbiologia-de-alimentos-para-consumo-humano-e-animal-metodo-horizontal-para-deteccao-enumeracao-e-sorotipagem-de-Salmonella-parte-1-deteccao-de-Salmonella-spp>. Accessed: 01/18/2024

Brazil, Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar Informe-2023, Ministry of Health. Health and Environment Surveillance Secretariat (2023). [/https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023). Accessed: 02/27/2024

Brosel-Oliu, S., Ferreira, R., Uria, N., Abramova, N., Gargallo, R., Muñoz-Pascual, F.-X., & Bratov, A. (2018). Novel impedimetric aptasensor for label-free detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 255, 2988–2995. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.121>

Butler, H. J., Brennan, P. M., Cameron, J. M., Finlayson, D., Hegarty, M. G., Jenkinson, M. D., Palmer, D. S., Smith, B. R., & Baker, M. J. (2019). Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer. *Nature Communications*, 10(1), 4501. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>

Caixeta, D. C., Aguiar, E. M. G., Cardoso-Sousa, L., Coelho, L. M. D., Oliveira, S. W., Espindola, F. S., Raniero, L., Crosara, K. T. B., Baker, M. J., Siqueira, W. L., & Sabino-Silva, R. (2020). Salivary molecular spectroscopy: A sustainable, rapid and non-invasive monitoring tool for diabetes mellitus during insulin treatment. *PloS One*, 15(3), e0223461. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223461>

CDC, Reports of Selected *Salmonella* Outbreak Investigations, Centers for Disease Control and Prevention. (2024). <https://www.cdc.gov/Salmonella/outbreaks.html>. Accessed: 01/25/2024

Chen, Z., Chen, K., Lou, Y., Zhu, J., Mao, W., & Song, Z. (2021). Machine learning applied to near-infrared spectra for clinical pleural effusion classification. *Scientific Reports*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87736-4>

Choo-Smith, L.-P., Maquelin, K., van Vreeswijk, T., Bruining, H. A., Puppels, G. J., Thi, N. A. N., Kirschner, C., Naumann, D., Ami, D., Villa, A. M., Orsini, F., Doglia, S. M., Lamfarraj, H., Sockalingum, G. D., Manfait, M., Allouch, P., & Endtz, H. P. (2001). Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational

Spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1461–1469. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1461-1469.2001>

Delgado, E., Katcan, B., Stice, S., & Calle, A. (2024). Independent evaluation of a DNA microarray system for *Salmonella* detection in ground beef. *Food Microbiology*, 118, 104406. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104406>

EFSA. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *European Centre for Disease Prevention and Control*, 20(12), 273. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., Al-Saad, K., El-Azazy, M., El-Shafie, A. S., & Al-Saad, K. (2023). Introductory Chapter: Infrared Spectroscopy - Principles and Applications. In *Infrared Spectroscopy—Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109139>

Foley, S. L., Zhao, S., & Walker, R. D. (2007). Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(3), 253–276. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0085>

Glassford, S. E., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2013). Recent applications of ATR FTIR spectroscopy and imaging to proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1834(12), 2849–2858. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.07.015>

Goormaghtigh, E., Raussens, V., & Ruyschaert, J. M. (1999). Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1422(2), 105–185. [https://doi.org/10.1016/s0304-4157\(99\)00004-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4157(99)00004-0)

Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C. A. M., Jansen, C. C. C., Castelijns, G. A. A., van der Voort, M., & Biesta-Peters, E. G. (2018). Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PloS One*, 13(10), e0206316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>

Hosseini, H., & Jafari, S. M. (2020a). Chapter Eleven—Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients* (Vol. 4, pp. 347–410). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>

Hosseini, H., & Jafari, S. M. (2020b). Chapter Eleven—Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy of nanoencapsulated food ingredients. In S. M. Jafari (Ed.), *Characterization of Nanoencapsulated Food Ingredients* (Vol. 4, pp. 347–410). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00011-0>

Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., & Tiquia-Arashiro, S. (2023a). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1304081>

Kassem, A., Abbas, L., Coutinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel,

K., Li, X., & Tiquia-Arashiro, S. (2023b). Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: Advances, challenges, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1304081>

Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, *47*, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>

Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., & Travert, J. (2001a). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, *26*(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00113-8)

Mariey, L., Signolle, J. P., Amiel, C., & Travert, J. (2001b). Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, *26*(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0924-2031\(01\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2031(01)00113-8)

Mossoba, M. M., Al-Khaldi, S. F., Jacobson, A., Segarra Crowe, L. I., & Fry, F. S. (2003). Application of a disposable transparent filtration membrane to the infrared spectroscopic discrimination among bacterial species. *Journal of Microbiological Methods*, *55*(1), 311–314. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00114-3)

Naumann, D. S. C., & Helm, D. (1997). What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacteria cells? *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, 279. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1570854175633959296>

Nogueira, M. S., Barreto, A. L., Furukawa, M., Rovai, E. S., Bastos, A., Bertoncello, G., & Carvalho, L. F. das C. E. S. de. (2022). FTIR spectroscopy as a point of care diagnostic tool for diabetes and periodontitis: A saliva analysis approach. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *40*, 103036. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103036>

Ren, Y., Wei, J., Wang, Y., Wang, P., Ji, Y., Liu, B., Wang, J., González-Sapienza, G., & Wang, Y. (2022). Development of a streptavidin-bridged enhanced sandwich ELISA based on self-paired nanobodies for monitoring multiplex *Salmonella* serogroups. *Analytica Chimica Acta*, *1203*, 339705. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339705>

Severcan, F., Bozkurt, O., Gurbanov, R., & Gorgulu, G. (2010). FT-IR spectroscopy in diagnosis of diabetes in rat animal model. *Journal of Biophotonics*, *3*(8–9), 621–631. <https://doi.org/10.1002/jbio.201000016>

Shen, Y., Xu, L., & Li, Y. (2021). Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(1), 149–197. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12662>

Shinohara, N. K. S., Barros, V. B. de, Jimenez, S. M. C., Machado, E. de C. L., Dutra, R. A. F., & Lima Filho, J. L. de. (2008). *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência & Saúde Coletiva*, *13*, 1675–1683.

<https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>

Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J., & Bryce, D. L. (2014). *Spectrometric identification of organic compounds* (8^a). Wiley.

Smith, B. C. (1998). *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203750841>

Sundaram, J., Park, B., Hinton, A. Jr., Yoon, S. C., Windham, W. R., & Lawrence, K. C. (2012). Classification and Structural Analysis of Live and Dead *Salmonella* Cells Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 991–1004. <https://doi.org/10.1021/jf204081g>

Theophilou, G., Lima, K. M., Martin-Hirsch, P., Stringfellow, H., & L. Martin, F. (2016). ATR-FTIR spectroscopy coupled with chemometric analysis discriminates normal, borderline and malignant ovarian tissue: Classifying subtypes of human cancer. *Analyst*, 141(2), 585–594. <https://doi.org/10.1039/C5AN00939A>

Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636>

Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2016). *Microbiologia* (12^a). Artmed.

Tranter, G. E. (2016). FTIR Spectroscopy of Aqueous Solutions. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12157-2>

Uçar, M. K., Nour, M., Sindi, H., & Polat, K. (2020). The Effect of Training and Testing Process on Machine Learning in Biomedical Datasets. *Mathematical Problems in Engineering*, 2020, e2836236. <https://doi.org/10.1155/2020/2836236>

Wang, J., McIvor, M. J., Elliott, C. T., Karoonuthaisiri, N., Segatori, L., & Biswal, S. L. (2014). Rapid Detection of Pathogenic Bacteria and Screening of Phage-Derived Peptides Using Microcantilevers. *Analytical Chemistry*, 86(3), 1671–1678. <https://doi.org/10.1021/ac403437x>

WHO. (2022). *Expert Meeting on the pre- and post-harvest control of non-typhoidal Salmonella spp. In poultry meat*. <https://www.who.int/publications/m/item/joint-fao-who-expert-meeting-on-the-pre-and-post-harvest-control-of-non-typhoidal-Salmonella-spp.-in-poultry-meat>. Accessed: 11/24/2023

WHO. (2023). *Salmonella (Salmonella)*. World Health Organization. <https://www.cdc.gov/Salmonella/general/index.html>. Accessed: 01/23/2024

Yang, X., Zhou, X., Zhu, M., & Xing, D. (2017). Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosensors & Bioelectronics*, 91, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.044>

Zambry, N. S., Aad Najib, M., Awang, M. S., Selvam, K., Khalid, M. F., Bustami, Y., Hamzah, H. H., Ozsoz, M., Abd Manaf, A., & Aziah, I. (2022). Aptamer-Based Electrochemical Biosensors for the Detection of *Salmonella* : A Scoping Review. *Diagnostics*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12123186>

TABLES

Table 1: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with biomolecular components frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating *Salmonella* serovars (External validation data).

PCs	Wavenumber cm ⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC-1	3395	C-H stretching	Lipid
PC-2	3292	C-H stretching	Lipid
PC-4	627	N-H bendig	Protein
PC-3	1659	N-H bendig	Protein
PC-4	1654	N-H bendig	Protein
PC-4	1659	N-H bendig	Protein
PC-1	1515	Aromatic C=C stretching	Protein
PC-3	1540	Aromatic C=C stretching	Protein
PC-4	1629	N-H bending	Protein
PC-2	1050	C-H bending	Carbohydrates
PC-4	1025	C-H bending	Carbohydrates

Adapted from (Kassem *et al.*, 2023b; Silverstein *et al.*, 2014; Smith, 1998).

Table 2: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with biomolecular components frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating *Salmonella* serovars (Training data).

PCs	Wavenumber cm⁻¹	Band assignment	Biomolecular components
PC1	3368	C-H stretching	Lipid
PC 5	2922	Carboxylic acids O-H stretching	Lipid
PC 2	1624	N-H bending	Protein
PC 2	1624	N-H bending	Protein
PC 3	1662	N-H bending	Protein
PC 4	1657	N-H bending	Protein
PC 5	1659	N-H bending	Protein
PC 3	1545	Aromatic C=C stretching	Protein
PC 2	1037	C-H bending	Carbohydrates
PC 3	1036	C-H bending	Carbohydrates
PC 4	1020	C-H bending	Carbohydrates
PC 5	1055	C-H bending	Carbohydrates

Adapted from (Kassem *et al.*, 2023b; Silverstein *et al.*, 2014; Smith, 1998).

Table 3 - Sensitivity, specificity, and precision values were determined for the external validation data following artificial intelligence analysis of the data obtained from the ATR-FTIR biosensor.

Performance	Random Forest		SVM ^b		Logistic Regression	
	Value	95% ci	Value	95% ci	Value	95% ci
Sensitivity	94,74%	73,97%- 99,87%	94,74%	73,97%- 99,87%	100%	82,35%- 100%
Specificity	97,98%	92,89%- 99,75%	97,98%	92,89%- 99,75%	96,97%	91,40%- 99,37%
PPV	46,89	11,85- 185,65	46,89	11,85- 185,65	33,00	10,83- 100,57
NPV	0,05	0,01- 0,36	0,05	0,01- 0,36	0	
LR+	90%	69,45%- 97,27%	90%	69,45%- 97,27%	86,36%	67,51%- 95,07%
LR -	98,98%	93,50%- 99,85%	98,98%	93,50%- 99,85%	100%	96,23%- 100%
Accuracy	97,46%	92,75%- 99,47%	97,46%	92,75%- 99,47%	97,46%	92,75%- 99,47%

PPV: Positive predictive value. NPV: negative predictive value. LR+: Positive likelihood ratio. LR-: Negative likelihood ratio.

^a Predictive performance was calculated using MEDCALC online platform

^b Support vector machines

FIGURES

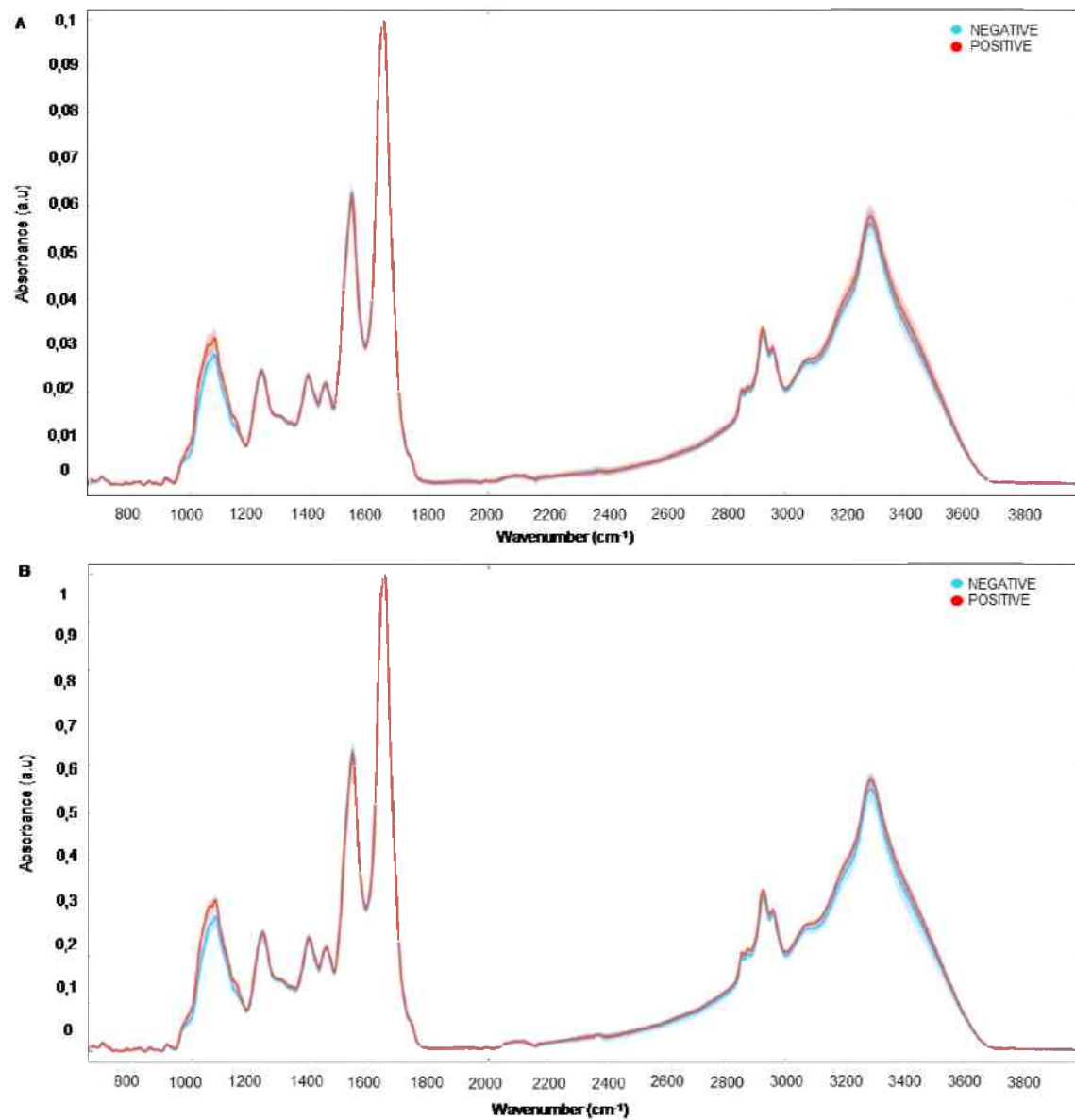


Figure 1 – The average spectral profile of the sample groups for training (A) and external validation (B) data is presented. In red are the averages of the IR spectra for the positive group (SE), and in blue are the averages for the negative groups (SG, SH, SD, ST).

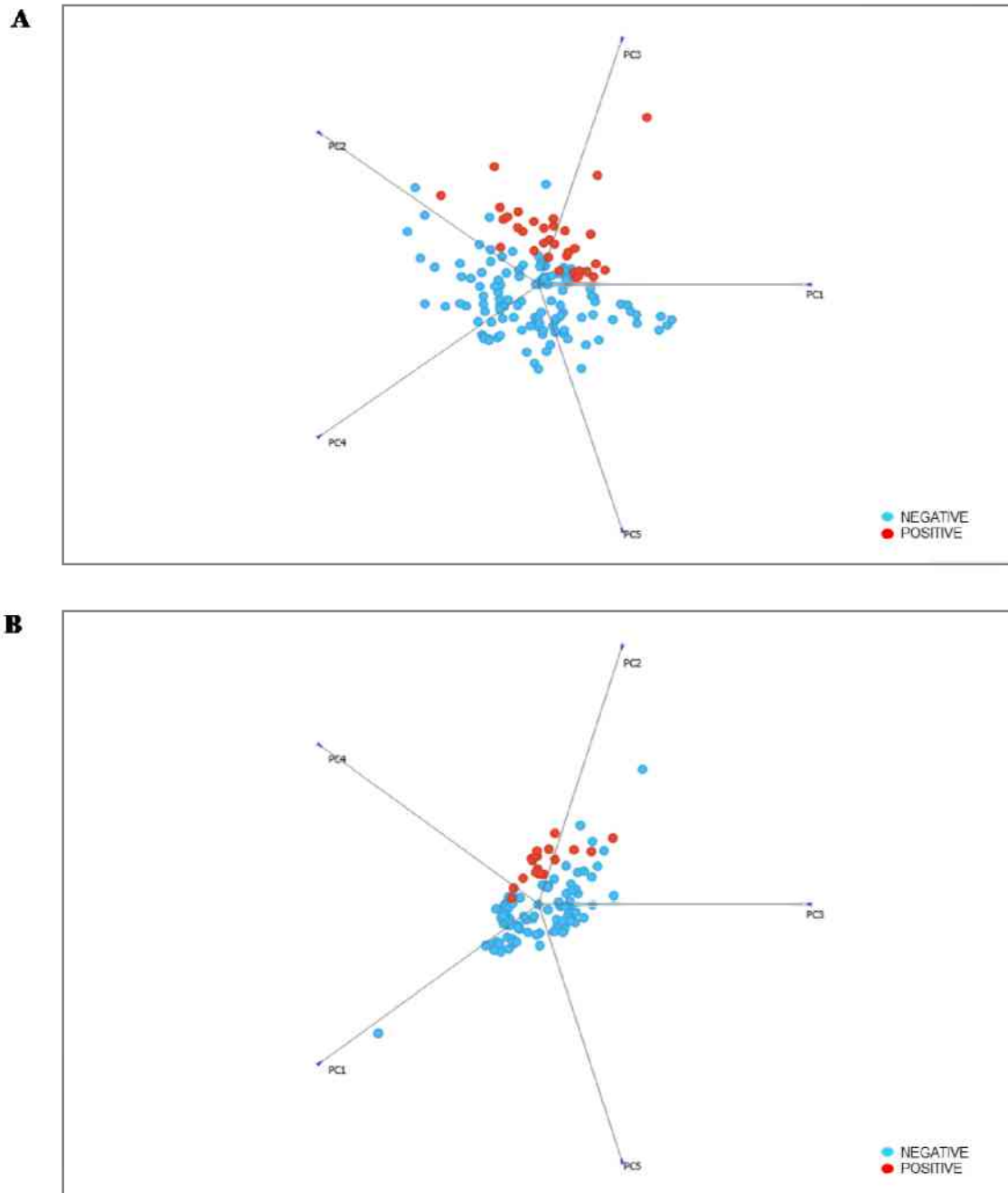


Figure 2 – Graphs of principal component analysis (PCA) for training data and external validation data are presented. A) 100% explained variance was found for the training data. B) 100% explained variance was found for the external validation data. Positive samples (SE) are represented in red, and negative samples (SG, SH, SD, ST) are represented in blue.

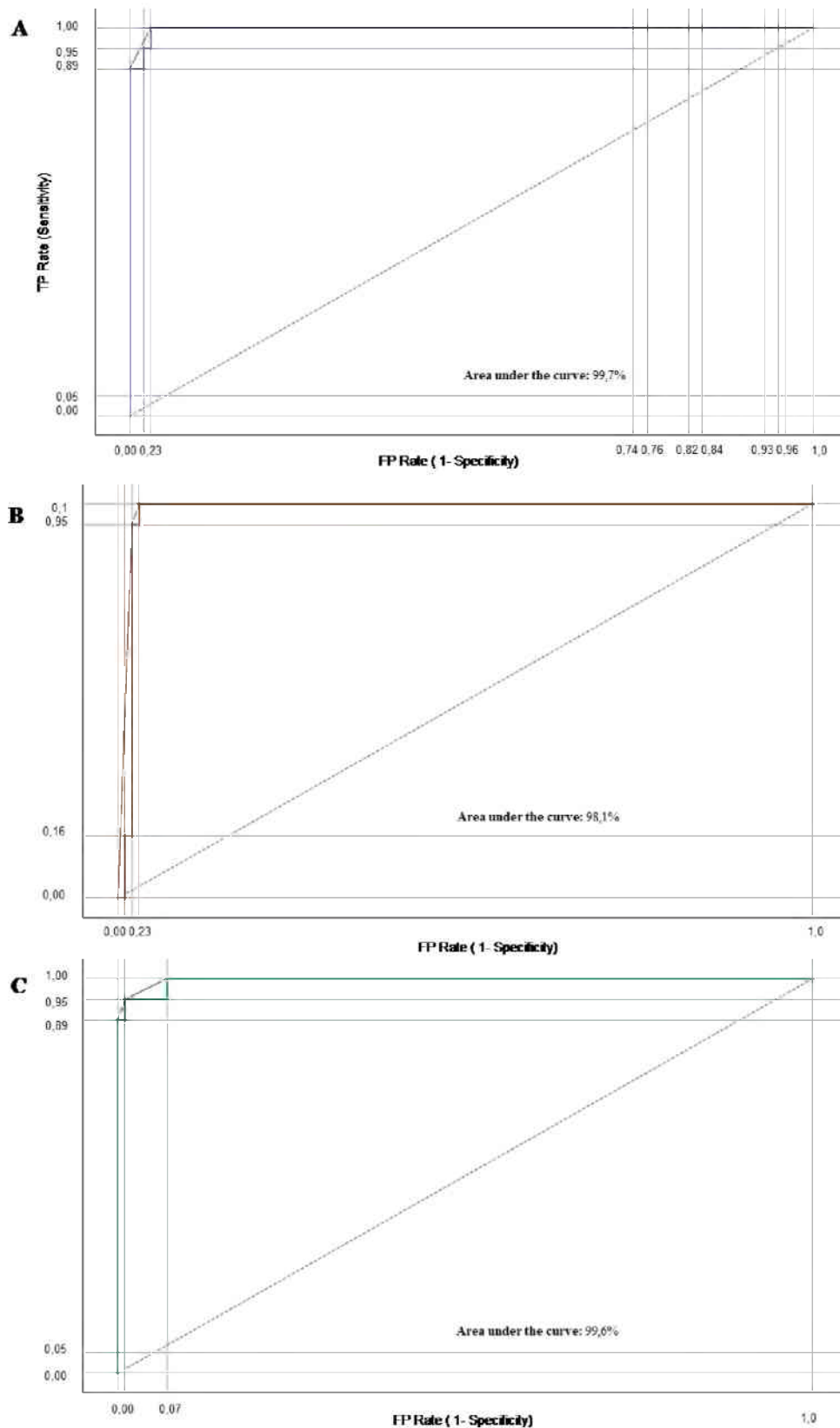
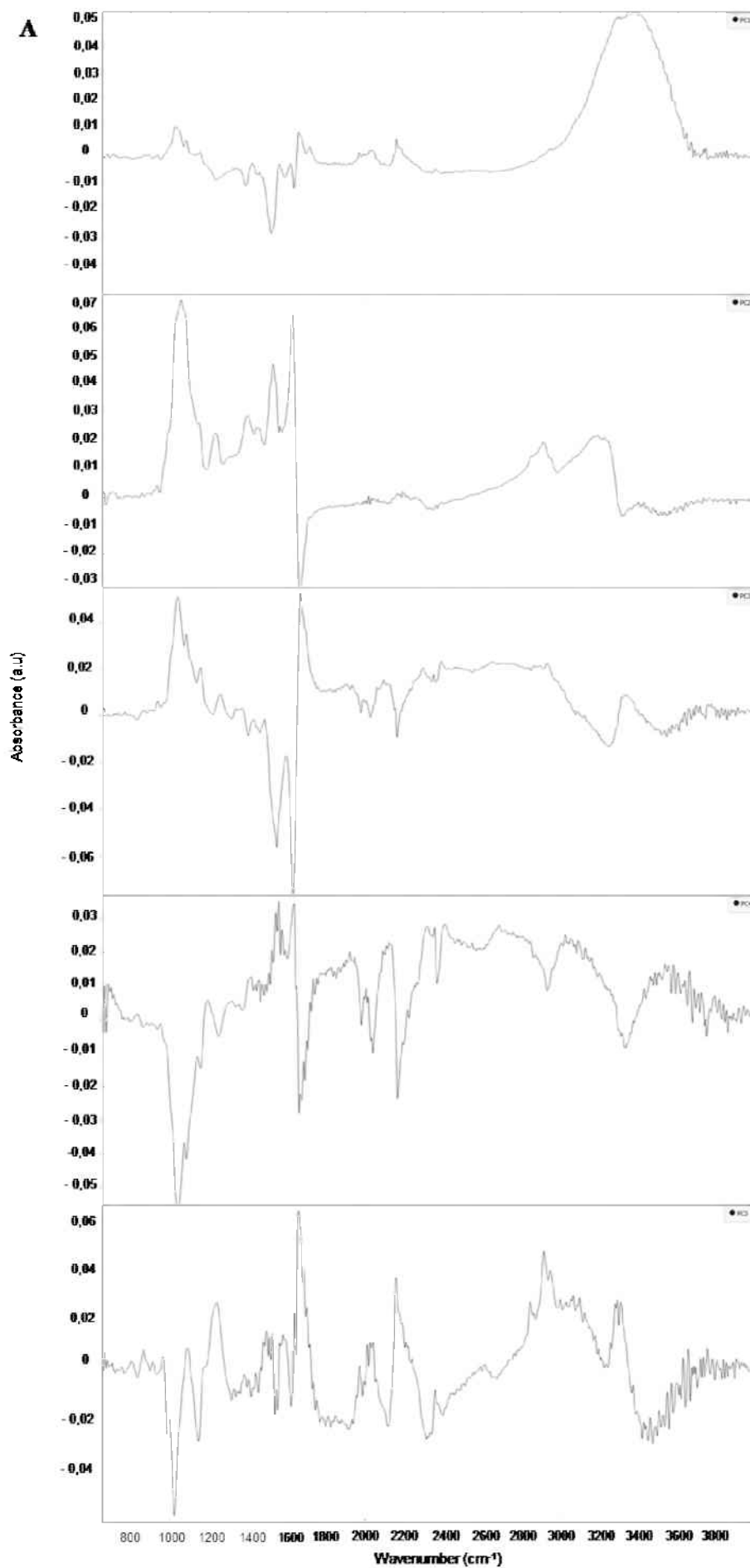
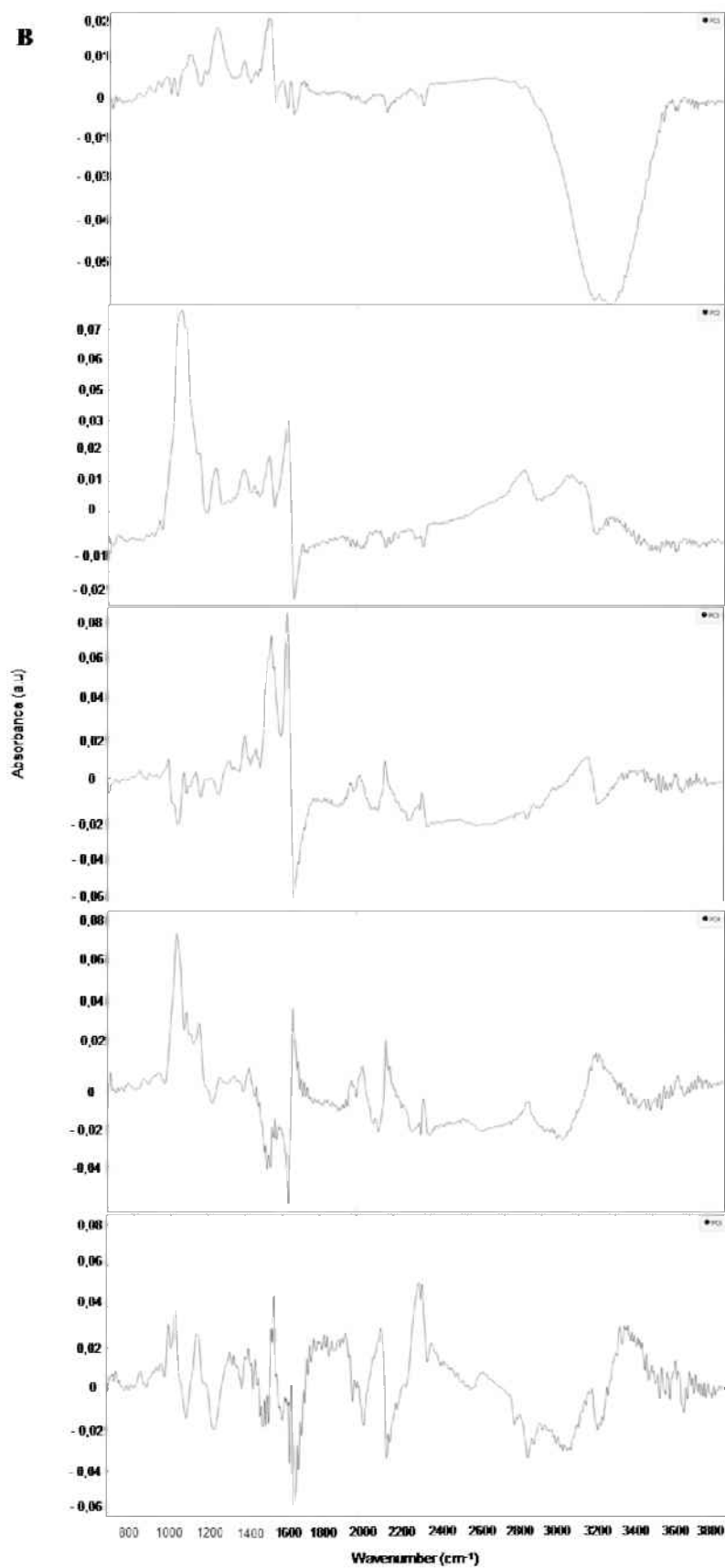


Figure 3 The area under the curve (AUC_{ROC}) values for the external validation data from the three best prediction models are presented: (A) Random Forest model result, (B) Logistic Regression result, and (C) SVM model result.





Supplementary figure 1– The wavelength of the greatest contribution of the five main components (PC1-2, PC2, PC3, PC4, and PC5) is depicted for both the training data (A) and external validation data (B).

		Predicted		Σ	
		NEGATIVE	POSITIVE		
A	Random Forest	Actual NEGATIVE	123	1	124
		Actual POSITIVE	2	32	34
		Σ	125	33	158
SVM	Random Forest	Actual NEGATIVE	97	2	99
		Actual POSITIVE	1	18	19
		Σ	98	20	118
Logistic Regression	Random Forest	Actual NEGATIVE	123	1	124
		Actual POSITIVE	0	34	34
		Σ	123	35	158
SVM	Random Forest	Actual NEGATIVE	97	2	99
		Actual POSITIVE	1	18	19
		Σ	98	20	118
Logistic Regression	Random Forest	Actual NEGATIVE	122	2	124
		Actual POSITIVE	1	33	34
		Σ	123	35	158
SVM	Random Forest	Actual NEGATIVE	96	3	99
		Actual POSITIVE	0	19	19
		Σ	96	22	118

Supplementary figure 2- The predictive performance of the Random Forest, SVM, and Logistic Regression models for the training data (A) and external validation data is presented.