



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) como plataforma para detecção de *Salmonella* Typhimurium

Aluno: Pedro Lucas Figueiredo Nunes

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Belchiorina Beatriz Fonseca

Coorientadora: Dr^ª. Fabiana de Almeida Araújo Santos

**UBERLÂNDIA – MG
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada
(ATR-FTIR) como plataforma para detecção de *Salmonella* Typhimurium**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Belchiolina Beatriz Fonseca
Coorientadora: Fabiana de Almeida Araújo Santos

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica.**

**UBERLÂNDIA - MG
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N972
2024

Nunes, Pedro Lucas Figueiredo, 1999-

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) como plataforma para detecção de *Salmonella* Typhimurium [recurso eletrônico] / Pedro Lucas Figueiredo Nunes. - 2024.

Orientadora: Belchiorina Beatriz Fonseca.

Coorientadora: Fabiana de Almeida Araújo Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.5196>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Fonseca, Belchiorina Beatriz, 1978-, (Orient.). II. Santos, Fabiana de Almeida Araújo, 1983-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

André Carlos Francisco
Bibliotecário Documentalista - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB				
Data:	Vinte e nove de julho de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	14:30h
Matrícula do Discente:	12222GBI010				
Nome do Discente:	Pedro Lucas Figueiredo Nunes				
Título do Trabalho:	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (ATR-FTIR) como plataforma para detecção de <i>Salmonella Typhimurium</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Nanobiotecnologia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de plataformas teranósticas para controle de patógenos de aves.				

Aos vinte e nove dias do mês de julho de dois mil e vinte e quatro, às 14:00h, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Belchiolina Beatriz Fonseca (Orientadora), Érica Crosara Ladir de Lucca e Emilia Rezende Vaz. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Belchiolina Beatriz Fonseca apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor (a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o (a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o (a) candidato(a):

(A) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. 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 **Belchiolina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 02/08/2024, às 13:25, 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 **Emília Rezende Vaz, Usuário Externo**, em 02/08/2024, às 13:53, 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 02/08/2024, às 14:43, 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 **5505278** e o código CRC **510FFD53**.

*Aos meus pais, Gilberto e Leonice, pelo
amor, carinho e apoio incondicional em
todos os momentos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar força para continuar e nunca desistir.

Bia e Fabiana, meu muito obrigado por me ajudarem a realizar meu sonho, sem vocês nada disso seria possível.

Uma dedicação especial a Bruna por ter me ajudado tanto e sido uma verdadeira amiga ao longo da execução desse projeto.

A todos do Nanos, meus colegas e amigos. Também agradeço a todos do Ladoc pelo suporte.

Meu apoio familiar, minhas avós, tias, meus sogros e primos. Muito obrigado.

Laura por ser uma companheira prestativa e tão amada, que ainda fez minha lista de tabelas e figuras.

À FAPEMIG pelos recursos financeiros que tornaram possível a realização e conclusão do projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta minha conquista, muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

Table 1: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with functional group(s) frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating Salmonella serovars (External validation data).....	36
Table 2: Wavenumber and potential chemical assignments of bands associated with functional group(s) frequently found in ATR-FTIR spectra for discriminating Salmonella serovars (Training data).....	37
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.	38
Table 4: 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.	39

LISTA DE FIGURAS

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 (ST), and in blue are the averages for the negative groups (SG, SH, SD, SE). 40

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 (ST) are represented in red, and negative samples (SG, SH, SD, SE) are represented in blue. 41

Figure 3: The area under the curve (AUCROC) values for the training data (1) external validation data (2) from the three best prediction models are presented: (A) Random Forest model result, (B) Logistic Regression result, and (C) SVM model result. 42

Figure 4 : The predictive performance of the Random Forest, SVM, and Logistic Regression models for the training data (A) and external validation data (B). 48

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	3
CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
1. Salmonella spp.....	4
1.1. Classificação e nomenclatura	4
1.2. Patogenicidade e Epidemiologia	6
1.3. Identificação e Isolamento.....	8
1.4. Confirmação	9
1.5. Salmonella na avicultura	10
1.6. Controle e legislação	13
2. FTIR	14
REFERÊNCIAS	17
CAPITULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	24
ABSTRACT	25
1. Introduction	26
2. Materials and methods.....	26
2.1. Salmonella spp. strains and sample preparation	28
2.2. Collection of infrared spectra	28
2.3. Data segregation for use in Artificial Intelligence (AI)	29
2.4. Multivariate analyzes	29
3. Results and discussion.....	30
4. Conclusion.....	33

RESUMO

A *Salmonella* é um patógeno responsável por causar diversas doenças transmitidas por alimentos. Esta pesquisa integra a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (ATR-FTIR) com inteligência artificial (IA) para identificar *Salmonella* Typhimurium (ST). Espectros de infravermelho (IR) foram coletados a partir de cinco sorotipos de *Salmonella*: ST, *S. Gallinarum* (SG), *S. Enteritidis* (SE), *S. Heidelberg* (SH) e *S. Dublin* (SD). O conjunto de dados foi dividido aleatoriamente em 155 amostras para treinamento e 120 amostras para validação externa, a fim de desenvolver um banco de dados abrangente sobre *Salmonella*. Os modelos de aprendizado de máquina que demonstraram desempenho preditivo superior incluíram Random Forest, Máquinas de Vetores de Suporte (SVM) e Redes Neurais. O modelo Random Forest alcançou uma precisão notável de 100,00% durante a validação cruzada e 98,33% na validação externa. O estudo identificou o Random Forest para validação externa (sensibilidade: 100,00%, especificidade: 98,00%, AUC: 99,5%) e o SVM (sensibilidade: 100,00%, especificidade: 96,00%, AUC: 98,5%) como os modelos mais eficazes para distinguir ST de outros sorotipos de *Salmonella*. Os resultados ressaltam que a combinação de ATR-FTIR com aprendizado de máquina oferece uma abordagem diagnóstica rápida, econômica e aplicável in loco, apresentando um grande potencial para a detecção de *Salmonella*.

Palavras chave: ATR-FTIR, *Salmonella* Typhimurium, Análise de Componentes Principais, Inteligência Artificial, Aprendizado de Máquina, Diagnóstico.

ABSTRACT

Salmonella is a significant pathogen implicated in numerous foodborne diseases. This research integrates attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) with artificial intelligence (AI) to identify *Salmonella* Typhimurium (ST). Infrared (IR) spectra were collected from five *Salmonella* serotypes: ST, *S. Gallinarum* (SG), *S. Enteritidis* (SE), *S. Heidelberg* (SH), and *S. Dublin* (SD). The dataset was split randomly into 155 samples for training and 120 samples for external validation to develop a comprehensive *Salmonella* database. The machine learning models demonstrating superior predictive performance included Random Forest, Support Vector Machine (SVM), and Neural Network. Random Forest achieved a remarkable accuracy of 100.00% during cross-validation and 98.33% in external validation. The study identified Random Forest for external validation (sensitivity: 100.00%, specificity: 98.00%, AUC: 99.5%) and SVM (sensitivity: 100.00%, specificity: 96.00%, AUC: 98.5%) as the most effective models for distinguishing ST from other *Salmonella* serotypes. The findings underscore that combining ATR-FTIR with machine learning offers a rapid, cost-effective, and on-site applicable diagnostic approach, presenting substantial promise for *Salmonella* detection.

Keywords: ATR-FTIR, *Salmonella* Typhimurium, Principal Component Analysis, Artificial Intelligence, Machine Learning, Diagnostic.

APRESENTAÇÃO

A primeira parte deste trabalho consiste em uma revisão abrangente da literatura sobre *Salmonella spp.*. Nesta seção, é explorada detalhadamente a nomenclatura, classificação, características físico-químicas, virulência e patogenicidade da *Salmonella*. Além disso, é discutido os métodos atuais de isolamento que são considerados o “padrão ouro” para a identificação e diferenciação de *Salmonella*, destacando suas implicações na saúde pública e os sorotipos mais prevalentes. Essa revisão fornece uma base sólida para entender a complexidade e a importância de *Salmonella* como patógeno. *Salmonella* é um gênero de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, com mais de 2.500 sorotipos conhecidos. Cada sorotipo possui características específicas que influenciam sua virulência e patogenicidade. A revisão aborda como esses fatores contribuem para a capacidade de *Salmonella* causar doenças em humanos e animais, e como eles são utilizados para diferenciar entre os diversos sorotipos.

Os métodos de isolamento discutidos incluem técnicas microbiológicas tradicionais, como a cultura bacteriana em meios seletivos, testes bioquímicos e serológicos, além de métodos moleculares como PCR e qPCR. Esses métodos são considerados o “padrão ouro” devido à sua eficácia na detecção e diferenciação de *Salmonella*. No entanto, também são abordadas as limitações desses métodos, como o tempo necessário para a obtenção dos resultados e a necessidade de laboratórios bem equipados e pessoal especializado.

Além disso, esta seção inclui uma revisão sobre a espectroscopia de Infravermelho Transformada de Fourier (FTIR) e sua variante com a espectroscopia de Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR). Essas técnicas são apresentadas como ferramentas promissoras na microbiologia para a identificação de microrganismos. A FTIR permite a obtenção de espectros vibracionais que atuam como *fingerprints* moleculares, enquanto o ATR-FTIR oferece a vantagem adicional de ser uma técnica não destrutiva e de rápida análise.

Na segunda parte do trabalho, é apresentado um artigo científico que explora o uso de ATR-FTIR combinado com algoritmos de aprendizado de *machine learning* para identificação de *Salmonella*. Este estudo demonstra como a integração dessas tecnologias pode melhorar significativamente a precisão e a velocidade dos diagnósticos microbiológicos, oferecendo uma alternativa eficaz aos métodos tradicionais. A aplicação de técnicas de *machine learning*, como *Random Forest*, *Support Vector Machine* (SVM) e *Neural Network*, permitiu a criação de modelos preditivos capazes de identificar *Salmonella Typhimurium* com alta acurácia, destacando o potencial dessas abordagens na prática clínica e laboratorial.

CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. é um dos patógenos alimentares mais relevantes no mundo. É responsável por causar infecções gastrointestinais tanto em seres humanos, quanto em animais (JAJERE, 2019). O gênero contém inúmeras espécies e é responsável por causar cerca de 93,8 milhões de casos de gastroenterite, que acarretam a 155.000 mortes em todo o mundo a cada ano (TENNANT et al., 2016). Os sintomas quando são ocasionados pela doença autolimitada, duram cerca de 2 a 7 dias, mas podem ser desde casos leves, quanto graves (GALÁN-RELAÑO et al., 2023). A bactéria, em alguns casos, pode se propagar pela corrente sanguínea, levando a casos de sepse, o que exige um tratamento adequado com antibióticos. As principais medidas para controle da salmonelose, inclui a redução da prevalência em animais e a prevenção de infecções em seres humanos, com isso é possível assegurar uma base sólida para prevenir a transmissão da *Salmonella* por alimentos e outros meios, assim reduzindo os impactos na saúde pública (GALÁN-RELAÑO et al., 2023).

1.1. Classificação e nomenclatura

A *Salmonella* spp. foi nomeada no ano de 1900, em homenagem a Daniel Salmon, após isolar um microrganismo conhecido como *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis de suínos. Esse nome foi baseado na forma em que o hospedeiro se comportava clinicamente quando infectado com essa bactéria. Entretanto, a grande diversidade de sorovares que possuíam características não específicas de um determinado hospedeiro, acarretou em uma designação ao mesmo sorovar em hospedeiros distintos, em locais diferentes. Somente a partir do ano de 1920, um grupo de pesquisadores, liderados por Fritz Kauffmann, em Copenhagen, e por Philip Bruce White, em Londres, que foi unificada a taxonomia, tendo o trabalho reconhecido pelo subcomitê de *Salmonella* da Sociedade Internacional de Microbiologia, em 1933, como o esquema de Kauffmann-White.

Atualmente temos que o gênero está composto por duas espécies que possuem diferenças genéticas: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a primeira está dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (PERUZY et al., 2022).

Os sorotipos não são considerados espécies, portando, não deve ser escrito em itálico. Como por exemplo: *Salmonella enteria* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis. A *Salmonella* spp. é considerada o gênero de bactéria mais importante na família *Enterobacteriaceae*.

Os sorovares são reconhecidos a partir da caracterização de antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Entre todas as espécies, a subespécie *S. enterica* apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% de todos os isolamentos de animais de sangue quente. Atualmente há cerca de 2500 sorovares incluídos nas duas espécies *S. enterica* e *S. bongori* (LAMAS et al., 2018).

Morfológicamente, as *Salmonellas* são bacilos gram negativos, anaeróbicos facultativos e possuem flagelos peritríquios, exceto por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (FORSYTHE, 2013). A parede celular das Salmonelas é revestida por uma camada complexa de lipopolissacarídeos, fímbrias e algumas proteínas da membrana externa, que atuam como uma barreira protegendo-as da ação de substâncias nocivas e facilitam a adesão e invasão do epitélio do trato intestinal (BERNDT et al., 2007). São capazes de formar ácido e, na maioria das vezes, gás a partir da glicose, com exceção da *S. Typhi*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Possuem capacidade de fermentação de arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol (BRASIL, 2011). A grande parte das salmonelas com relevância clínica, não fermentam lactose, contudo muitas cepas podem adquirir essa característica por transferência plasmidial. São oxidase negativa, catalase positiva, produzem gás sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase (BRASIL, 2011).

O habitat natural das salmonelas possui três divisões, se baseando na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado. A *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifoide e paratifoide) são altamente adaptadas ao homem (CAETANO; PAGANO, 2019; SAÚDE; MANUAL, 2011). Já a *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo nos animais (SAÚDE; MANUAL, 2011). A terceira categoria é composta por sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, que são zoonóticas, as quais são responsáveis por quadros de gastroenterite e por doenças transmitidas por alimentos (SAÚDE; MANUAL, 2011). Possuem distribuição mundial e são responsáveis por índices elevados de morbidade e mortalidade em países emergentes e desenvolvidos, gerando de pequenos a grandes surtos

envolvendo produtos de origem animal como ovos, aves carnes e lácteos (SAÚDE; MANUAL, 2011).

1.2. Patogenicidade e Epidemiologia

A severidade das infecções por *Salmonella* spp. em seres humanos varia conforme o tipo específico da bactéria e a saúde do hospedeiro. Indivíduos como crianças menores de 5 anos, idosos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido são mais suscetíveis à infecção do que aqueles saudáveis. Quase todas os sorovares de *Salmonella* são patogênicas, possuindo a capacidade de invadir, se reproduzir e sobreviver dentro das células do hospedeiro humano, potencialmente causando doenças fatais(ENG et al., 2015).

Quando a *Salmonella* invade células não fagocíticas, utiliza uma estratégia notável ao induzir sua própria fagocitose para entrar na célula hospedeira (TAKAYA et al., 2003). Esse processo é mediado pelas ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPIs), agrupamentos genéticos que residem em uma grande região do DNA cromossômico e codificam as estruturas envolvidas na invasão. Ao entrar no trato digestório via água ou alimentos contaminados, as bactérias tendem a se alojar nas células epiteliais que revestem a parede intestinal. As SPIs codificam sistemas de secreção do tipo III, compostos por proteínas de múltiplos canais que permitem à *Salmonella* injetar seus efetores no citoplasma das células epiteliais intestinais. Esses efetores bacterianos ativam vias de sinalização e reorganizam o citoesqueleto de actina das células hospedeiras, levando à formação de protrusões ou dobras na membrana celular para capturar as bactérias(ENG et al., 2015).

A habilidade das cepas de *Salmonella* spp. em persistir dentro das células hospedeiras é crucial para sua virulência, pois aquelas incapazes de fazê-lo são não virulentas (BAKOWSKI; BRAUN; BRUMELL, 2008). Após a entrada da *Salmonella* na célula hospedeira, ela é envolvida em um compartimento membranosos chamado vacúolo, formado pela membrana da própria célula hospedeira. Normalmente, a presença dessas bactérias ativaria a resposta imune da célula hospedeira, resultando na fusão do vacúolo com lisossomos e na liberação de enzimas para destruir as bactérias intracelulares. Entretanto, a *Salmonella* utiliza o sistema de secreção do tipo III para injetar outras proteínas efetoras no vacúolo, modificando sua estrutura (ENG et al., 2015).

O vacúolo modificado impede a fusão com lisossomos, permitindo a sobrevivência e replicação intracelular das bactérias. A capacidade dessas bactérias de persistir dentro de

macrófagos facilita seu transporte pelo sistema retículo-endotelial (RES) (ENG et al., 2015; MONACK; MUELLER; FALKOW, 2004).

A salmonelose é amplamente reconhecida como a zoonose mais difundida globalmente. Devido ao ciclo de transmissão que envolve praticamente todos os vertebrados e sua propagação por meio da ingestão de alimentos, o controle da salmonela representa um desafio significativo para a saúde pública (SHINOHARA et al., 2008). Isso é especialmente relevante devido ao surgimento de novos sorovares e à ressurgência de outros em diversas regiões, tanto em países em desenvolvimento quanto em países industrializados (TEKLEMARIAM et al., 2023).

Um dos principais desafios epidemiológicos associados aos animais é o estado de portador assintomático, no qual a falta de sintomas e as limitações técnicas na detecção tornam esses animais uma fonte contínua de contaminação ambiental e alimentar (BRASIL, 2011). A presença de *Salmonella* spp. em animais criados para fins comerciais destaca esse microrganismo como o agente etiológico mais incidente e relevante em infecções intestinais, resultando em perdas significativas para a indústria, particularmente na produção de bovinos, suínos e aves, tanto para o mercado interno quanto para exportação (BRASIL, 2011).

Especificamente nas aves, a transmissão de *Salmonella* spp. pode ocorrer verticalmente (de galinha para ovo) ou horizontalmente. A prática histórica de consumir ovos crus foi desafiada pela descoberta de transmissão transovariana, destacando a importância de cozinhar alimentos adequadamente para evitar infecções (STELLA et al., 2021). A transmissão horizontal, que envolve todos os sorovares, pode ocorrer via ambiente, onde roedores atuam como portadores assintomáticos por longos períodos, disseminando o microrganismo entre diferentes áreas. A contaminação por meio de rações também é uma preocupação, embora sua extensão ainda seja objeto de debate. Medidas de controle são adotadas pelos criadores para mitigar possíveis contaminações, dado que a eliminação completa é impraticável (SILVA; DUARTE, 2002).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma preocupação séria para a saúde humana e animal, recebendo atenção de organizações como a Organização Mundial da Saúde. A resistência tem sido observada em uma ampla gama de espécies animais, incluindo animais selvagens e domésticos (SILVA et al., 2020). Embora a terapia antimicrobiana não seja geralmente recomendada para infecções diarreicas, é frequentemente usada de forma indiscriminada, o que pode levar ao aumento da resistência antimicrobiana, especialmente em países em desenvolvimento (AFUM et al., 2022). Por exemplo, na Ásia, *Salmonella* Typhi apresenta uma resistência de até

50% ao cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina, com o uso de fluoroquinolonas. (NAIR; VENKITANARAYANAN; JOHNY, 2018).

A salmonelose representa um desafio complexo em sua epidemiologia e controle, com variações regionais devido a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de produção de alimentos, criação de animais e padrões de higiene (MARCHELLO; CARR; CRUMP, 2020). Controlar a disseminação da doença é uma tarefa difícil, especialmente com o surgimento de novos sorovares e a ressurgência de outros em áreas específicas, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (WALDMAN, 2000).

1.3. Identificação e Isolamento

O método ISO 6579: 2002 é o padrão ouro para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos e rações. O método foi alterado em 2007 para incluir o teste de fezes de animais e amostras ambientais de produção primária. Métodos padrão semelhantes foram publicados por outros organismos, especialmente no Manual Analítico Bacteriológico (BAM) da USFDA (RAPID MICROBIOLOGY, 2011; ISO, 2002).

Geralmente são usadas 25g de amostras de alimentos que são cultivadas em testes de detecção, mas alimentos secos requerem uma etapa a mais para recuperar células danificadas em meios de pré-enriquecimento não seletivos, como água peptonada tamponada, antes de novos cultivos. Além disso, alguns alimentos secos, especialmente ervas e especiarias e cebolas secas, contêm compostos que podem inibir o crescimento da *Salmonella* em culturas de enriquecimento. Esses compostos devem ser neutralizados, seja pela adição de um agente neutralizante adequado, ou por diluição adicional (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

O primeiro estágio nos métodos tradicionais de detecção para a maioria das amostras de alimentos geralmente é um cultivo pré-enriquecido em meio líquido não seletivo, como água peptonada tamponada, incubado a 37°C por 18 horas. A cultura de pré-enriquecimento é então tipicamente subcultivada em dois meios de enriquecimento seletivo diferentes, como o caldo Rappaport Vasiliadis Soja (RVS) e o caldo Muller-Kauffmann Tetratitionato-Novobiocina (MKTTn), e incubada por mais 24 horas a 41.5°C (RVS) ou a 37°C (MKTTn) (RAPID MICROBIOLOGY, 2011; ISO, 2002).

A cultura de enriquecimento seletivo geralmente é inoculada em pelo menos dois meios de ágar seletivo e incubada a 37°C por 24 horas. O método ISO especifica o ágar XLD e um meio

seletivo opcional. Uma variedade de alternativas está disponível, incluindo ágar sulfite de bismuto, ágar verde brilhante e ágar entérico Hektoen. Vários meios cromogênicos seletivos especificamente projetados para a diferenciação de colônias de *Salmonella* estão comercialmente disponíveis. Colônias típicas de *Salmonella* em ágar seletivo são subcultivadas em meios não seletivos antes de testes confirmatórios (RAPID MICROBIOLOGY, 2011 ; ISO, 2002).

Os kits e testes rápidos de *Salmonella* utilizam várias tecnologias diferentes, incluindo técnicas de cultura inovadoras, separação imunomagnética, ensaios baseados em EIA (Enzyme Immunoassays) e ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) incorporando detecção fluorescente ou colorimétrica, simples ensaios de fluxo lateral incorporando tecnologia imunocromatográfica e técnicas moleculares como hibridização de DNA e ensaios baseados em PCR, muitos dos quais agora incluem detecção em tempo real. Alguns métodos podem ser automatizados para triar grandes números de amostras (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

1.4. Confirmação

Existem procedimentos bem estabelecidos de confirmação e identificação para *Salmonella* spp. A identificação preliminar baseada na aparência da colônia em meios seletivos cromogênicos e outros ágar é tradicionalmente confirmada usando testes bioquímicos clássicos para *Salmonella* e testes sorológicos. Testes bioquímicos chave incluem fermentação de glicose, reação de urease negativa, descarboxilação de lisina, teste de indol negativo, produção de H₂S e fermentação de dulcitol. Os testes de confirmação sorológica geralmente usam antissoros polivalentes para antígenos flagelares (H) e somáticos (O). Isolados com um perfil bioquímico típico, que aglutinam com ambos os antissoros H e O, são identificados como *Salmonella* spp. Quando os resultados são inconclusivos, pode ser necessário realizar testes bioquímicos adicionais para *Salmonella* (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

Isolados positivos geralmente são enviados para sorotipagem adicional para identificar o sorovar usando antissoros específicos. No entanto, esta é normalmente uma tarefa para laboratórios de referência especializados e raramente é realizada em laboratórios de alimentos ou clínicos de rotina.

Laboratórios de referência também são capazes de tipar isolados ainda mais usando técnicas como tipagem de fagos, susceptibilidade a antibióticos e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

Embora nem sempre aceito pela legislação, muitos métodos de confirmação e identificação rápidos foram desenvolvidos para *Salmonella* e muitos deles foram transformados em produtos comerciais. Além disso, muitos dos kits de detecção rápida mencionados acima também podem ser usados para testes confirmatórios. A confirmação bioquímica pode ser realizada usando sistemas comerciais de identificação (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

Métodos moleculares também estão disponíveis, especialmente ensaios de hibridização de DNA e PCR para a identificação de *Salmonella enterica*. No entanto, esses geralmente são projetados para uso como parte de um método para detecção e triagem rápida, em vez de para confirmação. Uma variedade de técnicas de tipagem baseadas em DNA também foram desenvolvidas para uso por laboratórios especializados envolvidos na investigação de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Até mesmo o sequenciamento do genoma completo se tornou uma ferramenta prática para a caracterização de cepas de *Salmonella* implicadas em surtos (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

Os kits e testes rápidos de *Salmonella* utilizam várias tecnologias diferentes, incluindo técnicas de cultura inovadoras, separação imunomagnética, ensaios baseados em EIA (Enzyme Immunoassays) e ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) incorporando detecção fluorescente ou colorimétrica, simples ensaios de fluxo lateral incorporando tecnologia imunocromatográfica e técnicas moleculares como hibridização de DNA e ensaios baseados em PCR, muitos dos quais agora incluem detecção em tempo real. Alguns métodos podem ser automatizados para triar grandes números de amostras (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

Os kits e testes rápidos de *Salmonella* utilizam várias tecnologias diferentes, incluindo técnicas de cultura inovadoras, separação imunomagnética, ensaios baseados em EIA (Enzyme Immunoassays) e ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assays) incorporando detecção fluorescente ou colorimétrica, simples ensaios de fluxo lateral incorporando tecnologia imunocromatográfica e técnicas moleculares como hibridização de DNA e ensaios baseados em PCR, muitos dos quais agora incluem detecção em tempo real. Alguns métodos podem ser automatizados para triar grandes números de amostras (RAPID MICROBIOLOGY, 2011).

1.5. *Salmonella* na avicultura

Nas aves as salmonelas podem causar quadros agudos e/ou crônicos dependendo da enfermidade acometida. Temos 3 doenças que são classificadas de acordo com características

clínicas: a pulrose, causada pela *S. Pullorum*, o tifo aviário causado pela *S. Gallinarum* e infecções paratíficas que são ocasionadas por sorovares de *Salmonella* que não são específicos, como a *S. Enteritidis* e *Typhimurium* (DOS SANTOS et al., 2015).

O grupo de salmonelas específico de aves (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), não ocasionam doenças em humanos em caso de consumo de carnes contaminadas, são consideradas relevantes apenas para a saúde animal. Geram infecções mais severas nas aves, que comprometem de forma significativa o trato digestório e todo o corpo da ave. Possuem alta taxa de mortalidade e interferem no desempenho zootécnico, afetando a sua produção. Quando partimos para as salmonelas paratíficas, observamos uma não especificidade por hospedeiro, podendo abranger uma ampla gama de mamíferos, répteis e aves (MUNIZ et al., 2015).

O grupo de sorovares paratíficos é amplo e apresenta como característica uma doença mais branda, altamente adaptada ao hospedeiro. Esses sorovares realizam uma extensa colonização intestinal e podem ou não causar infecção sistêmica. Nesse caso, os humanos que consomem carnes contaminadas, podem adoecer e gerar quadros de salmonelose. Portanto, quando se trata de saúde pública, o grupo de sorovares paratíficos apresentam grande relevância (BARROS; LIMA; STELLA, 2020).

O nível de patogenicidade depende de uma série de fatores associados à bactéria, às aves e às condições de criação. Acredita-se que a ausência de flagelos na *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* resulta na não ativação de uma proteína de membrana (TLR-5) que reconhece a flagelina bacteriana e estimula a resposta imunológica, induzindo assim, uma resposta imune pró-inflamatória de menor intensidade na mucosa intestinal, o que favorece a infecção sistêmica observada no tifo aviário e na pulrose (BARROS; LIMA; STELLA, 2020).

Ao penetrar no intestino, o agente é capturado por células de defesa (macrófagos, fagócitos e células dendríticas), entretanto, as bactérias dispõem de mecanismos para impedir a ação dessas células. Dentro dessas células, as bactérias se replicam, bem como percorrem a corrente sanguínea do hospedeiro atingindo órgãos internos. A colonização inicial acontece no fígado e baço, a partir daí a doença progride afetando principalmente o sistema reprodutivo e digestório. Após esse período, os sintomas têm início e o ciclo completo se instala (HUBERMAN, 2016).

Apenas por volta do 5º dia pós-infecção, quando a *Salmonella* coloniza o intestino, tem início a disseminação da bactéria pelas fezes, levando a uma vasta contaminação ambiental. Infecções causadas por *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em poedeiras comerciais podem ser

influenciadas por fatores como: idade da ave, resistência genética, qualidade do manejo, período de maturidade sexual, manejo nutricional, muda forçada, produção altamente adensada, sorotipo envolvido e dose infectante. Uma vez infectadas as galinhas vão produzir um terço dos seus ovos internamente contaminados com *S. Gallinarum*, permitindo a transmissão vertical da doença, ou seja, existe a possibilidade de transmissão do agente aos pintinhos ainda durante a ovulação (DE CORT et al., 2013; HUBERMAN, 2016).

A *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium são os sorovares paratíficos responsáveis pela grande maioria das infecções graves em humanos mundialmente (TACK et al., 2020). Essas infecções possuem potencial maior de severidade especialmente em grupos de riscos, como crianças, idosos e pessoas com comprometimento imunitário, podendo causar febre, diarreia, náuseas, vômitos e cólicas abdominais. Em casos raros, pode levar a sepse e causar quadros mais graves, embora a mortalidade geralmente seja inferior a 1%. No entanto, a infecção por *S. Enteritidis* apresenta uma taxa de mortalidade de 3,6% nos surtos, particularmente em idosos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012).

Na União Europeia (UE), a salmonelose é a segunda maior causa de infecção gastrointestinal em humanos e uma relevante fonte de surtos de origem alimentar. Em 2019, a salmonelose em humanos teve uma taxa de incidência de 20 casos por 100.000 habitantes, mantendo-se estável em relação a 2018. Os sorotipos de *Salmonella* mais notificados em 2019 foram *S. Enteritidis* (50,3%), *S. Typhimurium* (11,9%) e *S. Typhimurium* monofásica (1,4%, 12 : i : -) (8,2%), representando 70,3% dos 79.300 casos humanos confirmados com conhecimento do sorotipo responsável (BOELAERT et al., 2021) .

Nos Estados Unidos (EUA), Enteritidis e Typhimurium estavam entre os seis sorotipos mais frequentes reportados em 2019. A *S. Enteritidis* tem sido a causa mais comum de infecções por *Salmonella* desde 2007, com uma incidência de 2,6 por 100.000, que não diminuiu. A *S. Typhimurium* passou do sorotipo mais comum entre 1996-1998, para o terceiro mais comum em 2019 (TACK et al., 2020).

A *Salmonella* Enteritidis está fortemente associada a casos em galinhas poedeiras (PIRES; DE KNEGT; HALD, 2017). Pode ocorrer a transmissão de uma ave infectada para o ovo, antes da formação da casca (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012). Além disso, o comércio internacional de galinha poedeiras infectadas pode contribuir para a propagação global deste

sorotipo (LI et al., 2021). Por outro lado, a Typhimurium tem sido principalmente associada à suinocultura (ARNOLD et al., 2021; PIRES; DE KNEGT; HALD, 2017).

1.6. Controle e legislação

A prevenção é a estratégia mais eficaz para controlar a disseminação de bactérias e é baseada em medidas fundamentais de isolamento, biossegurança e monitoramento das granjas. Isso inclui a remoção imediata de animais infectados, a eliminação de animais domésticos como galinhas e outras aves da propriedade, e a luta contínua contra animais invasores e pragas para erradicar a doença (BARROS; LIMA; STELLA, 2020).

O controle de *Salmonella* em abatedouros de aves envolve a implementação de programas de monitoria, verificação de resultados laboratoriais e medidas de inspeção e prevenção em todas as etapas do processo produtivo, além de monitoramento da contaminação nas carcaças e do processo. É fundamental respeitar o jejum pré-abate, manter as carcaças limpas, lavar e monitorar as carcaças, e regular e manter as máquinas (BARROS; LIMA; STELLA, 2020). Além disso, é crucial uma fiscalização rígida da procedência e do status sanitário das aves, e em caso de positividade para sorotipos específicos, devem ser tomadas ações corretivas. Embora não haja garantias de obtenção de carne de aves livre de *Salmonellas*, é fundamental adotar medidas que dificultem a propagação da bactéria em ambientes avícolas (BARROS; LIMA; STELLA, 2020).

Para participar do mercado internacional, é essencial atender aos requisitos institucionais do processamento industrial seguro, considerando a Saúde Pública e o comércio ético. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece legislações para a indústria avícola, alinhadas com o *Codex Alimentarius* (CA), um programa internacional da FAO e OMS (SANTOS et al., 2013). As normas do CA abrangem qualidade e segurança alimentar. A fiscalização higiênico-sanitária dos estabelecimentos é realizada pelos serviços de inspeção estatais, conforme a Lei Nº 1.283 de 1950, que exige prévia fiscalização para produtos de origem animal (BRASIL, 1950).

A implementação do Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para o abate de aves, seguindo a Portaria nº 46 de 1998, é obrigatória em todas as indústrias de produtos de origem animal (BRASIL, 1998). O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), estabelecido pela Portaria nº 193 de 1994, regula a produção avícola, visando

certificação sanitária e qualidade dos produtos para mercados nacional e internacional (BRASIL 1994). Os padrões microbiológicos de alimentos são definidos pela Resolução – RDC Anvisa Nº 12/2001, com parâmetros específicos para *Salmonella* spp. em carnes de aves (BRASIL 2001).

Instruções normativas estabelecem padrões para controle e certificação de estabelecimentos avícolas, garantindo a ausência de *S. Gallinarum* e *Pullorum*, e controle de *S. Enteritidis* e *Typhimurium*. Em 2009, procedimentos de monitoramento específicos para salmoneloses aviárias em estabelecimentos de frango de corte foram implementados. O Ministério da Agricultura forneceu diretrizes para a implantação do sistema APPCC no setor de abate de aves, visando garantir alimentos seguros e de qualidade para comercialização (BRASIL 2009).

Programas de monitoramento são implementados para garantir a segurança alimentar, como o controle de *Salmonellas* em estabelecimentos avícolas. A partir de 2012, o monitoramento sanitário para *Salmonellas* em estabelecimentos avícolas é regulamentado com mais rigor, seguido por programas de gestão de risco diferenciado em 2013 (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013) (BRASIL 2012). A Instrução Normativa nº 20 de 2016 estabelece o controle e monitoramento de *Salmonella* spp. em estabelecimentos avícolas comerciais, visando reduzir a prevalência e proteger os consumidores (BRASIL 2016).

2. FTIR

O FTIR surgiu como uma ferramenta revolucionária e crucial para a análise molecular. Essa técnica é baseada no princípio que cada molécula é capaz de absorver frequências específicas de infravermelho que gera uma correspondência entre essas interações em suas ligações químicas. Com os dados de absorbância adquiridas na leitura do processo, é possível identificar estruturas moleculares e alterações químicas no alvo de interesse (KASSEM et al., 2023) .

O FTIR vem sendo aplicado em diversas áreas científicas, inclusive na área da saúde. No caso da microbiologia, é geralmente usado para uma rápida e precisa identificação de microrganismos, permitindo em uma redução do tempo de infecção e em uma terapia mais direcionada (KAMNEV et al., 2023).

O princípio da técnica consiste na exposição de uma amostra a luz infravermelha, quando as moléculas do alvo de interesse absorvem a luz com frequências específicas, acarreta

em uma vibração das ligações químicas da molécula. Diferentes tipos de vibrações como C-O, O-H e N-H, possuem frequências vibracionais únicas, o que leva a padrões singulares de absorbância (GRIFFITHS, 1983; KOCZON et al., 2023). Apesar de todos os compostos orgânicos possuírem como base o mesmo grupo de elementos, temos que cada microrganismo ou material alvo, possui uma complexidade individual de ligações que pode ser detectada e gerar um padrão distinguível, que é chamado de fingerprint (KASSEM et al., 2023).

No espectro do infravermelho médio temos a faixa vibracional de moléculas mais relevante, que vai de 4,000 a 400 cm^{-1} (GRIFFITHS, 1983). Utilizam-se cinco faixas espectrais distintas para análise molecular. A primeira faixa (3.000 a 2.800 cm^{-1}) é marcada pelas vibrações de estiramento C-H dos grupos CH_3 e CH_2 , associadas principalmente a ácidos graxos de membrana e cadeias laterais de aminoácidos. A segunda faixa (1.800 a 1.500 cm^{-1}) apresenta picos dos grupos amida I e II em proteínas e peptídeos, além de vibrações de grupos ésteres em lipídios e absorções de ácidos nucleicos. A terceira faixa (1.500 a 1.200 cm^{-1}) é influenciada por proteínas, ácidos graxos e compostos com grupos fosfato. A quarta faixa (1.200 a 900 cm^{-1}) é caracterizada por vibrações de estiramento simétrico dos grupos PO_2^- em ácidos nucleicos, carboidratos e polissacarídeos. A quinta faixa (900 a 700 cm^{-1}), conhecida como a região de impressão digital, revela oscilações de anéis aromáticos em aminoácidos e nucleotídeos (NANDIYANTO; OKTIANI; RAGADHITA, 2019; PIRUTIN et al., 2023).

Essas faixas são usadas para identificar grupos funcionais em compostos orgânicos e inorgânicos, utilizando suas bandas de absorção características no infravermelho. Frequências expressas em números de onda (cm^{-1}) permitem identificar grupos funcionais específicos, como a vibração de estiramento C=O de carbonilas (1.700-1.750 cm^{-1}) e a vibração de estiramento O-H de álcoois (3.200-3.600 cm^{-1}). A comparação das bandas de absorção no espectro da amostra com espectros de referência auxilia na identificação de grupos funcionais específicos. Entretanto, as posições dos picos podem variar devido a fatores como ambiente molecular, preparação da amostra e configurações do instrumento, o que ressalta a importância de consultar bancos de dados confiáveis e literatura para atribuições precisas (KASSEM et al., 2023).

Na microbiologia, a FTIR (Espectroscopia por Transformada de Fourier no Infravermelho) é amplamente aplicada em diversas pesquisas. A FTIR de transmissão mede a luz transmitida através de amostras sólidas, como paredes celulares microbianas e biofilmes, enquanto a FTIR por Reflexão Total Atenuada (ATR) é usada para amostras líquidas e sólidas

inadequadas para transmissão, permitindo análise sem extensa preparação ao medir o espectro infravermelho em contato com um cristal ATR (BAKER et al., 2014). Esse método minimiza a preparação da amostra e utiliza a onda evanescente gerada pela reflexão interna no cristal para interagir com a amostra (KASSEM et al., 2023).

A FTIR permite a obtenção de bandas de absorção ressonantes e complexas, semelhantes a impressões digitais, que servem como assinaturas para identificação, caracterização e quantificação de amostras. Ao irradiar uma amostra com luz infravermelha, o espectro resultante encapsula a composição química, oferecendo insights sobre variações taxonômicas ou alterações químicas devido a exposições ambientais (JANSSON et al., 2023). Essa técnica é valorizada na microbiologia por fornecer informações rápidas e não destrutivas sobre a composição molecular de microrganismos. Ela é utilizada para investigar a composição da parede celular bacteriana, formação de biofilmes, resistência a antibióticos, crescimento microbiano, atividade metabólica e dinâmica de comunidades microbianas. A técnica também fornece insights sobre interações microbianas com outros organismos e fatores ambientais, destacando sua ampla aplicação e importância (KASSEM et al., 2023; TIQUIA-ARASHIRO, 2019).

Para identificação microbiana, a FTIR é usada para detectar “impressões digitais” espectrais únicas de microrganismos, comparando os espectros de amostras a bancos de dados de referência. Métodos avançados de análise estatística multivariada, como Análise de Componentes Principais (PCA), análise de agrupamento hierárquico (HCA), análise discriminante linear (LDA), análise discriminante stepwise (SDA) e algoritmo de Ward são empregados para melhorar a precisão e eficiência na identificação e classificação bacteriana (BOMBALSKA et al., 2011; DE BRITO; LOURENÇO, 2021; FENG et al., 2020; MOUWEN et al., 2005). Desafios incluem a complexidade das amostras, sobreposição de sinais espectrais e falta de protocolos padronizados. No entanto, a FTIR continua a ser uma ferramenta crucial na identificação rápida e não destrutiva de microrganismos, contribuindo para diagnósticos precisos, monitoramento ambiental e aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- AFUM, T. et al. Diarrhea-Causing Bacteria and Their Antibiotic Resistance Patterns Among Diarrhea Patients From Ghana. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.894319>. PMID: 35663873.
- AGRAWAL, S. et al. A high affinity phage-displayed peptide as a recognition probe for the detection of Salmonella Typhimurium. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 40–45, 10 ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.027>.
- ALVES, L. V. R. C. et al. **Prevalência de infecções sexualmente transmissíveis em idosos no Brasil**. 2023. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36387>.
- ARNOLD, M. et al. Bayesian Source Attribution of Salmonella Typhimurium Isolates From Human Patients and Farm Animals in England and Wales. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.579888>.
- BAKER, M. J. et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v. 9, n. 8, 2014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.
- BAKOWSKI, M. A.; BRAUN, V.; BRUMELL, J. H. **Salmonella-containing vacuoles: Directing traffic and nesting to grow**. **Traffic**, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00827.x>.
- BARROS, I.; LIMA, T.; STELLA, A. SALMONELOSE AVIÁRIA E SAÚDE PÚBLICA: ATUALIDADES E O SEU CONTROLE NO BRASIL. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 32, 2020. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2020B42.
- BERNDT, A. et al. Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, 2007. <https://doi.org/10.1128/IAI.00695-07>.
- BESSER, J. M. Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. Food **Microbiology Academic Press**, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>.
- BOELAERT, F. et al. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal**, v. 19, n. 2, 2021. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.
- BOLTEN, S. et al. Population dynamics of Listeria spp., Salmonella spp., and Escherichia coli on fresh produce: A scoping review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13233>.
- BOMBALSKA, A. et al. Classification of the biological material with use of FTIR spectroscopy and statistical analysis. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 4, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.10.025>.

BOORE, A. L. et al. Salmonella enterica infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A Novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145416>.

BRASIL. **Lei nº 1.283 de 18 de janeiro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal.** 19/12/1950, 1950.

BRASIL. Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994. **Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola Cria o Comitê Consultivo do Programa.** Diário Oficial da União, Brasília, 1994. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/sanidade-avicola>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 46 de 10 de fevereiro de 1998.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, 10 de fevereiro de 1998, 1998.

BRASIL. ANVISA. **Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.** Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_12_2001_COMP.pdf/977fade8-a521-4a38-895d-ec4e39b4761b>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 36, de 6 de dezembro de 2012.** Diário Oficial da União, Brasília, 2012. Disponível em: < https://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/20121012_in20120612.pdf>.

BRASIL. Instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. **Dispõe sobre o controle e monitoramento de Salmonella sp.** Diário Oficial da União, Brasília, 2016.

CAETANO, F.; PAGANO, M. Prevalência de infecções causadas por Salmonella sp. no Brasil no período de 2013 a 2017. **Journal of Infection Control**, v. 8, n. 2, 2019. ISSN 2316-5324.

DE BRITO, N. M. R.; LOURENÇO, F. R. Rapid identification of microbial contaminants in pharmaceutical products using a PCA/LDA-based FTIR-ATR method. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, 2021. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000318899>.

DE CORT, W. et al. A Salmonella Enteritidis hilAssrAfliG deletion mutant is a safe live vaccine strain that confers protection against colonization by Salmonella Enteritidis in broilers. **Vaccine**, v. 31, n. 44, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.042>.

DOS SANTOS, L. A. et al. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de Salmonella spp. em abatedouros de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300003>.

DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. A. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. **Critical Reviews in Microbiology**, fev. 2011. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>.

DZIUBA, B. et al. Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 3, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.013>.

ECONOMIC RESEARCH SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foodborne illnesses caused by Salmonella cost the U.S. an estimated \$3.7 billion annually**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=77908>>. Acesso em: 2 mar. 2024.

ENG, S. K. et al. Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, 2015. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

FENG, B. et al. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. **Analytica Chimica Acta**, v. 1111, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.037>

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. **Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**, 2012.

FORSYTHE, S. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. [s.l: s.n.]. v. 2nd edição.

GALÁN-RELAÑO, Á. et al. **Salmonella and Salmonellosis: An Update on Public Health Implications and Control Strategies**. *Animals* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 dez. 2023. <https://doi.org/10.3390/ani13233666>.

GRIFFITHS, P. R. **Fourier transform infrared spectrometry**. *Science*, 1983.
HARICHANDRAN, D.; RADHAKRISHNAN, K.; DINESH. Antimicrobial susceptibility profile, treatment outcome and serotype distribution of clinical isolates of salmonella enterica subspecies enterica: A 2-year study from Kerala, South India. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, 2017. <https://doi.org/10.2147/IDR.S126209>.

HUBERMAN, Y. Tifosis aviar. **Servicios Agrícolas y Ganaderos**, n. 24, 2016.

JAJERE, S. M. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, 2019. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>.

JANSSON, M. M. et al. Vibrational spectroscopy and its future applications in microbiology. **Applied Spectroscopy Reviews**, 2023. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1942894>.

KAMNEV, A. A. et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Biofilms Formed by the Rhizobacterium Azospirillum baldaniorum Sp245: Aspects of Methodology and Matrix Composition. **Molecules**, v. 28, n. 4, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28041949>.

KIM, J. H. et al. Characterization of Salmonella spp.-specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 526–534, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15042>.

KOCZON, P. et al. The Analytical Possibilities of FT-IR Spectroscopy Powered by Vibrating Molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24021013>.

LAMAS, A. et al. A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica. **Microbiological Research**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>.

LAVILLA, M. et al. Specific peptides as alternative to antibody ligands for biomagnetic separation of Clostridium tyrobutyricum spores. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3219–3226, abr. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5621-z>.

LI, S. et al. Global spread of Salmonella Enteritidis via centralized sourcing and international trade of poultry breeding stocks. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25319-7>.

MAPA. Lei Nº. 7.889, De 23 De Novembro De 1989. **Publicado no Diário Oficial da União de 24/11/1989 , Seção 1**, 1989.

MARCHELLO, C. S.; CARR, S. D.; CRUMP, J. A. A systematic review on antimicrobial resistance among salmonella typhi worldwide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2020. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0258>.

MENCÍA-ARES, O. et al. Effect of antimicrobial use and production system on *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp. and *Salmonella* spp. resistance in Spanish swine: A cross-sectional study. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 1, p. 54–66, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1111/zph.12790>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº 10, de 11 de abril de 2013. **Secretaria de Defesa Agropecuária**, 2013.

MONACK, D. M.; MUELLER, A.; FALKOW, S. Persistent bacterial infections: The interface of the pathogen and the host immune system. **Nature Reviews Microbiology**, 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro955>.

MOUWEN, D. J. M. et al. Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by fourier transform infrared spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 8, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4318-4324.2005>.

MUNCK, N. et al. Application of Whole-Genome Sequences and Machine Learning in Source Attribution of *Salmonella* Typhimurium. **Risk Analysis**, v. 40, n. 9, 2020. <https://doi.org/10.1111/risa.13510>.

MUNIZ, E. C. et al. Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 3, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000300006>.

NAIR, D. V. T.; VENKITANARAYANAN, K.; JOHNY, A. K. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, 2018. <https://doi.org/10.3390/foods7100167>.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R. How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material. **Indonesian Journal of Science and Technology**, v. 4, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>.

NAPOLEONI, M. et al. A strong evidence outbreak of *salmonella enteritidis* in central Italy linked to the consumption of contaminated raw sheep milk cheese. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122464>.

PERUZY, M. F. et al. Occurrence and distribution of *Salmonella* serovars in carcasses and foods in southern Italy: Eleven-year monitoring (2011–2021). **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1005035>.

PIRES, S. M.; DE KNEGT, L.; HALD, T. Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human Salmonella infections in the European Union. **EFSA Supporting Publications**, v. 8, n. 8, 2017. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-184>.

PIRUTIN, S. K. et al. Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24086947>.

POPA, G. L.; IOAN POPA, M. Salmonella spp. infection-a continuous threat. **GERMS**. [s.l: s.n.]. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>.

RAPID Microbiology. Salmonella Detection and Identification Methods. Disponível em: <https://www.rapidmicrobiology.com/test-method/salmonella-detection-and-identification-methods>. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>.

SANTOS, J. R. et al. A Importância do Controle da Salmonella na Cadeia Produtiva de Frango de Corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, 2013. <https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v12n3p167-174>.

SAÚDE, M. DA; MANUAL. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da. Diagnóstico Laboratorial do Gênero Salmonella Série A. Normas e Manuais Técnicos**, 2011.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência e Saude Coletiva**, v. 13, n. 5, 2008a. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232008000500031>.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, 2008b. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>.

SILVA, R. A. DA et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em Debate**, v. 44, n. 126, 2020. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil Salmonella Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola Brazilian Journal of Poultry Science**, n. 42, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2002000200001>.

SONTAG, R. L. et al. Identification of Novel Host Interactors of Effectors Secreted by Salmonella and Citrobacter. **mSystems**, v. 1, n. 4, 2016. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00032-15>.

STELLA, A. E. et al. Salmonelose Aviária. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13835>.

TACK, D. M. et al. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2015–

2018. **American Journal of Transplantation**, v. 19, n. 6, 2019. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7140a2>.

TAKAYA, A. et al. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of mice. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.690-696.2003>.

TEKLEMARIAM, A. D. et al. Human Salmonellosis: A Continuous Global Threat in the Farm-to-Fork Food Safety Continuum. **Foods**, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12091756>.

TENNANT, S. M. et al. Nontyphoidal salmonella disease: Current status of vaccine research and development. **Vaccine**, v. 34, n. 26, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.072>.

TIQUIA-ARASHIRO, S. M. Synthesis of Metallic Nanoparticles by Halotolerant Fungi. In: **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**. [s.l: s.n.]. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19030-9_19.

WALDMAN, E. A. O controle das doenças infecciosas emergentes e a segurança sanitária. **Revista de Direito Sanitário**, v. 1, n. 1, 2000. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9044.v1i1p89-106>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>>. Acesso em: 2 mar. 2024.

XU, H. et al. Characterization of *Salmonella* serotypes prevalent in asymptomatic people and patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06340-Z>.

CAPITULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy associated to artificial intelligence can be an alternative to detect Salmonella *Typhimurium*

ABSTRACT

Salmonella is a significant pathogen implicated in numerous foodborne diseases. This research integrates attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) with artificial intelligence (AI) to identify *Salmonella* Typhimurium (ST). Infrared (IR) spectra were collected from five *Salmonella* serotypes: ST, *S. Gallinarum* (SG), *S. Enteritidis* (SE), *S. Heidelberg* (SH), and *S. Dublin* (SD). The dataset was split randomly into 155 samples for training and 120 samples for external validation to develop a comprehensive *Salmonella* database. The machine learning models demonstrating superior predictive performance included Random Forest, Support Vector Machine (SVM), and Neural Network. Random Forest achieved a remarkable accuracy of 100.00% during cross-validation and 98.33% in external validation. The study identified Random Forest for external validation (sensitivity: 100.00%, specificity: 98.00%, AUC: 99.5%) and SVM (sensitivity: 100.00%, specificity: 96.00%, AUC: 98.5%) as the most effective models for distinguishing ST from other *Salmonella* serotypes. The findings underscore that combining ATR-FTIR with machine learning offers a rapid, cost-effective, and on-site applicable diagnostic approach, presenting substantial promise for *Salmonella* detection.

Keywords: ATR-FTIR, *Salmonella* Typhimurium, Principal Component Analysis, Artificial Intelligence, Machine Learning, Diagnostic.

1. Introduction

Salmonella spp. is one of the primary pathogens responsible for gastrointestinal diseases on a global scale, affecting millions of individuals annually (BESSER, 2018). This bacterium causes debilitating symptoms such as nausea, vomiting, and diarrhea, which can escalate to severe complications including liver and kidney failure, potentially leading to death (POPA; IOAN POPA, 2021). The burden of these foodborne illnesses is particularly severe in regions of Africa and Southeast Asia, where the incidence and mortality rates among children under five years old reach alarming levels (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A growing concern is the rapid emergence of antimicrobial-resistant strains of *Salmonella*, which significantly reduces the effectiveness of conventional treatments (MENCÍA-ARES et al., 2021). In addition to public health impacts, salmonellosis imposes a significant economic burden. Estimates indicate that, in the United States, annual costs related to medical expenses, deaths, and self-treatment can reach 3.7 billion (ECONOMIC RESEARCH SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015). In this context, early and accurate detection of *Salmonella* is crucial to mitigate its adverse effects.

Gold method for detecting *Salmonella* is the microbiology followed by serology or PCR. Other methods such as latex agglutination tests, immunodiffusion, ELISA, and lateral flow assays, although widely used, are often laborious, time-consuming, and have limitations in terms of sensitivity and specificity (DWIVEDI; JAYKUS, 2011). These techniques rely on mono/polyclonal antibodies, the production of which requires animal immunization, presenting ethical and logistical challenges (AGRAWAL et al., 2016).

Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR FTIR) emerges as a revolutionary tool in detecting *Salmonella* Typhimurium. This technique allows the acquisition of characteristic vibrational spectra from samples, providing a unique molecular fingerprint (KOCZÓN et al., 2023). Integrating this methodology with advanced artificial intelligence (AI) algorithms enhances its application, enabling rapid and highly accurate analyses (KASSEM et al., 2023).

Artificial intelligence, particularly through machine learning techniques such as artificial neural networks and supervised algorithms, enables the creation of sophisticated predictive models.

These models can distinguish *Salmonella* Typhimurium from other microorganisms with remarkable accuracy based on complex spectral patterns (SUNDARAM et al., 2012).

Given the disadvantages of conventional methods for detecting *S. Typhimurium*, this study explores the synergy between ATR-FTIR and artificial intelligence as a groundbreaking approach. This innovative strategy aims not only to improve the sensitivity and specificity of detection but also to establish a new approach in the early identification of pathogens in clinical and environmental samples. Such an advance promises to revolutionize control and prevention procedures for foodborne disease outbreaks, providing a robust defense against the persistent threat of *Salmonella* infections.

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 ST, one strain of *S. Gallinarum* (SG), two strains of SE (SE), 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 strain (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. For each sample we performed 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 275 *Salmonella* samples were obtained, including 53 SE samples, 55 SG samples, 55 SH samples, 56 ST samples, and 56 SD samples.

2.2. Collection of infrared spectra

For ATR-FTIR analyses, ST samples were considered positive, while SG, SE, SH, and SD samples were considered negative. The samples were subsequently analyzed using a portable FTIR spectrophotometer coupled with an attenuated total reflectance unit (Agilent Technologies, Agilent Cary 630, Santa Clara, CA, USA) on two different days and with two equipment with same model. 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 650 to 4000 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 155 samples for the training data and 120 samples for the external validation data. In the training data, 119 negative samples (23.14% SE, 27.27% SD, 24.79% SH, 24.79% SG, 25.42%) and 36 positive samples were randomly separated. In the external validation data, there were 20 positive samples (100%) and 100 negative samples (25% SG, 25% SH, 25% ST, 25%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 ST were considered positive, and the other samples were considered negative.

2.5 Artificial Intelligence Algorithms

To develop the artificial intelligence algorithms, the absorbance data from the samples were processed by selecting the region of 650 – 4000 cm^{-1} and applying Gaussian smoothing, baseline correction using the Rubber Band model, normalization by the maximum-minimum model, and the Savitzky-Golay filter.

3- Results and discussion

For this study, the spectral region of $650 - 4000\text{ cm}^{-1}$ was carefully selected and processed to enhance the quality of the spectral data. Mid-infrared (MIR) spectra is a powerful tool for the identification and characterization of substances due to his ability to reveal the bonds present in molecular species, acting as "fingerprints" of the substances (GRIFFITHS, 1983). Figure 1 of this study illustrates the average spectra obtained for the positive and negative groups, in both the training data (Figure 1A) and external validation data (Figure 1B). These graphs highlight the spectral differences between the two groups, showcasing the variations that can be exploited for the identification and differentiation of ST and other bacterial serovars.

The Principal Component Analysis (PCA) was conducted on a sample set of 155 samples for training data and 120 samples for external validation. Five different *Salmonella* serotypes were used, as represented in Figure 2. This study indicated an explained variance of 87% in the training data (Figure 2A) and 83% in the external validation data (Figure 2B), both using three principal components (PC1, PC2, PC3) for data validation.

Tables 1 and 2 present the wavenumbers (cm^{-1}) and possible chemical assignments of bands corresponding to specific functional groups for the external validation and training data. These tables provide a detailed view of the specific frequencies associated with different functional groups, which are crucial for the differentiation of *Salmonella*.

The identified frequencies are associated with specific functional groups, such as C-H, O-H, N-H, and C=C stretching. These groups are important structural components of biomolecules present in bacterial cells. For example, the C-H stretching of alkyne and O-H stretching of alcohols and phenols (3355 cm^{-1} and 3979 cm^{-1}) are indicative of components of the cell wall and bacterial membranes (KASSEM et al., 2023) . These functional groups are essential for the structure and function of *Salmonella* cells, and their identification in the spectral samples confirms the presence of these bacteria.

Frequencies such as 1032 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} , and 1628 cm^{-1} are well-documented in the literature as selective for differentiating bacterial species (MOSSOBA et al., 2003; SUNDARAM et al., 2012). The presence of these wavenumbers in *Salmonella* samples suggests that they can be used as unique spectral signatures for this bacterium. The identification of C-O (1032 cm^{-1}) and C=C (1628 cm^{-1} , 1624 cm^{-1}) stretches reinforces this selectivity. These spectral signatures are

critical for the precise identification of *Salmonella*, allowing for a clear distinction between this and other bacterial species.

The use of these frequencies and principal components allows for the creation of predictive models that can quickly identify *Salmonella* in samples by comparing the obtained spectra with reference data. This approach facilitates rapid and accurate diagnoses, essential for clinical interventions and outbreak control measures. The speed and accuracy of FTIR and PCA-based identification are particularly useful in laboratory and clinical environments, where time and precision are crucial, as rapidly progressing diseases such as cancer (XUE et al., 2023).

To develop the artificial intelligence algorithms, the absorbance data from the samples were processed in the region of 650 – 4000 cm⁻¹, and the prediction models were trained with cross-validation, using 5 rounds of training and testing with a random sample group in the proportion of 80% training and 20% testing, Figure 4 displays their predictive performance. The top three models were then subjected to external validation.

For the Random Forest modeling, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 3) of the cross-validation data were 100.00%, 100.00%, 100.00%, and 100%, 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 100.00%, 100.00%, 100.00%, and 100%, respectively. For the Neural Network model, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 3) of the external validation data were 100.00%, 100.00%, 100.00%, and 100%, respectively.

For the Random Forest modeling, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 3) of the external validation data were 100.00%, 98.00%, 98.3%, and 99.5%, 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 100.00%, 96.00%, 96.67%, and 98.5%, respectively. For the Neural Network model, the sensitivity, specificity, test set accuracy (Table 3), and the area under the curve (AUC) (Figure 3) of the external validation data were 100.00%, 90.00%, 91.67%, and 97.9%, respectively.

The analysis of the results obtained with different machine learning models, such as Random Forest, Support Vector Machine (SVM), and Neural Networks, reveals important insights

about their effectiveness in identifying *Salmonella* from FTIR spectra. The area under the curve (AUC) is a fundamental metric for evaluating the performance of these models, as it offers an aggregate measure of a model's ability to distinguish between positive and negative classes.

Observing the AUC of the different models, the Random Forest maintained consistently high values in both cross-validation and external validation. This consistent performance indicates that Random Forest not only fit well to the training data but also generalized effectively to unseen data. This highlights it as the best model among those tested.

Despite the results obtained, it is essential to consider the impact of the dataset size on the performance and generalization of the models. Given the extremely high values of sensitivity, specificity, and accuracy, additional care and refinements in model training are suggested. Some improvements that can be implemented in future work include increasing the number of samples, especially from different *Salmonella* serotypes and under various experimental conditions, to enhance the robustness of the models. A larger and more diverse dataset allows the models to learn subtler variations and generalize better to new data.

The ISO 6579:2017 method is a widely recognized standard for *Salmonella* detection, but it is time-consuming and resource-intensive, requiring multiple steps and specialized media (ISO 6579-1:2017, 2017). Techniques like ELISA and molecular methods such as multiplex qPCR and traditional PCR, while effective, are expensive and require highly trained personnel (YAGER; DOMINGO; GERDES, 2008; LAN et al., 2022; VANDESOMPELE et al., 2002).

ATR-FTIR spectroscopy offers a promising alternative due to its simplicity, efficiency, and rapid results. Although it requires an initial investment, it significantly reduces operational costs by eliminating the need for reagents and complex procedures. This method is user-friendly and can be performed by less specialized technicians (SILVA et al., 2016). The combination of ATR-FTIR with AI further enhances diagnostic reliability, allowing for the rapid and accurate identification of *Salmonella* and other microorganisms with high sensitivity and specificity rates, as shown in this study, comparable to molecular techniques (KELLY et al., 2011; LAM et al., 2019; CHIMENO-TRINCHET et al., 2020; KASSEM et al., 2023).

4- Conclusion

In conclusion, ATR-FTIR represents a significant innovation in the detection of *Salmonella* Typhimurium, offering a combination of speed, precision, and cost-effectiveness that surpasses many of the limitations of traditional methods. As technology advances and the database expands, ATR-FTIR spectroscopy, coupled with machine learning techniques, may become the tool of choice for the rapid and accurate identification of pathogens in various contexts, revolutionizing diagnostic practices in clinical and environmental microbiology.

Acknowledgments

I would like to extend my gratitude to the funding agencies CAPES, FAPEMIG, and CNPQ for their financial support. Special thanks to the INCT in Teranóstica e Nanobiotecnologia (INCT-TeraNano) for their invaluable contribution, under the CNPq Process nº 403193/2022-2 and FAPEMIG Process nº CBB - APQ-03613-17. Your support has been crucial for the successful completion of this research.

REFERENCES

- AGRAWAL, S. et al. A high affinity phage-displayed peptide as a recognition probe for the detection of Salmonella Typhimurium. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 40–45, 10 ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.027>.
- BESSER, J. M. Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. Food Microbiology. **Academic Press**, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.018>.
- CHIMENO-TRINCHET, C. et al. Artificial Intelligence and fourier-transform infrared spectroscopy for evaluating water-mediated degradation of lubricant oils. **Talanta**, v. 219, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121312>.
- DWIVEDI, H. P.; JAYKUS, L. A. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions. **Critical Reviews in Microbiology**, fev. 2011. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.506430>.
- ECONOMIC RESEARCH SERVICE U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foodborne illnesses caused by Salmonella cost the U.S. an estimated \$3.7 billion annually**. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/chart-gallery/gallery/chart-detail/?chartId=77908>>. Acesso em: 2 mar. 2024.
- GRIFFITHS, P. R. Fourier transform infrared spectrometry. **Science**, 1983. <https://doi.org/10.1002/047010631X>.
- ISO 6579-1:2017. (Annex D) Microbiology of the food chain, Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella spp. **Part 1: Detection of Salmonella spp.**, v. 2017, 2017.
- KASSEM, A. et al. Corrigendum: Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1304081>.
- KELLY, J. G. et al. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: A multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, 2011. <https://doi.org/10.1021/pr101067u>.
- KOCZON, P. et al. The Analytical Possibilities of FT-IR Spectroscopy Powered by Vibrating Molecules. **International Journal of Molecular Sciences**, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24021013>.
- LAM, L. M. T. et al. Reagent-free identification of clinical yeasts by use of attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.1128/JCM.01739-18>.
- LAN, Z. et al. Hundreds-Dollar-Level Multiplex Integrated RT-qPCR Quantitative System for Field Detection. **Biosensors**, v. 12, n. 9, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12090706>.

MENCÍA-ARES, O. et al. Effect of antimicrobial use and production system on *Campylobacter* spp., *Staphylococcus* spp. and *Salmonella* spp. resistance in Spanish swine: A cross-sectional study. **Zoonoses and Public Health**, v. 68, n. 1, p. 54–66, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1111/zph.12790>.

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, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00114-3](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00114-3).

POPA, G. L.; IOAN POPA, M. *Salmonella* spp. infection-a continuous threat. **GERMS**. [s.l: s.n.]. <https://doi.org/10.18683/germs.2021.1244>.

SILVA, S. et al. Discrimination of clinically relevant: *Candida* species by Fourier-transform infrared spectroscopy with attenuated total reflectance (FTIR-ATR). **RSC Advances**, v. 6, n. 94, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6ra16769a>.

SILVERSTEIN, R. W.; BASSLER, G. C. Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 39, n. 11, 1962.

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

SUNDARAM, J. et al. 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**, v. 60, n. 4, 2012. <https://doi.org/10.1021/jf204081g>.

UÇAR, M. K. et al. The Effect of Training and Testing Process on Machine Learning in Biomedical Datasets. **Mathematical Problems in Engineering**, v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2836236>.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, 2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths**. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>>. Acesso em: 2 mar. 2024.

XUE, Y. et al. Rapid diagnosis of cervical cancer based on serum FTIR spectroscopy and support vector machines. **Lasers in Medical Science**, v. 38, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10103-023-03930-y>.

YAGER, P.; DOMINGO, G. J.; GERDES, J. **Point-of-care diagnostics for global health. Annual Review of Biomedical Engineering**, 2008. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160524>.

TABLES

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

Principal Component	Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional Group(s)	Reference Frequency (cm ⁻¹)
PC1	3308	Alkyne C-H Stretching; Alcohols and Phenols O-H Stretching; Amines N-H Stretching	3300; 3200-3600; 3300-3500
PC1	1511	Aromatic C=C Stretching; Amines N-H Bending	1450-1600; 1560-1640
PC1	1619	Alkene C=C Stretching; Aromatic C=C Stretching	1620-1680; 1450-1600
PC2	1053	C-O Stretching (Alcohols, Phenols, Esters)	1000-1260
PC2	2891	Alkane C-H Stretching	2850-2960
PC2	1536	Amines N-H Bending; Amides N-H Bending	1560-1640; 1550-1670
PC3	1628	Alkene C=C Stretching; Aromatic C=C Stretching	1620-1680; 1450-1600
PC3	1649	Alkene C=C Stretching	1620-1680
PC3	1526	Amines N-H Bending; Amides N-H Bending	1560-1640; 1550-1670

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

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

Principal Component	Wavenumber (cm ⁻¹)	Functional Group(s)	Reference Frequency (cm ⁻¹)
PC1	3355	Alkyne C-H Stretching; Alcohols and Phenols O-H Stretching; Amines N-H Stretching	3300; 3200-3600; 3300-3500
PC1	1509	Aromatic C=C Stretching; Amines N-H Bending	1450-1600; 1560-1640
PC1	3979	Alcohols and Phenols O-H Stretching	3200-3600
PC2	1032	C-O Stretching (Alcohols, Phenols, Esters)	1000-1260
PC2	1672	Alkene C=C Stretching; Ketones and Aldehydes C=O Stretching	1620-1680; 1680-1750
PC2	1628	Alkene C=C Stretching; Aromatic C=C Stretching	1620-1680; 1450-1600
PC3	1624	Alkene C=C Stretching; Aromatic C=C Stretching	1620-1680; 1450-1600
PC3	1537	Amines N-H Bending; Amides N-H Bending	1560-1640; 1550-1670
PC3	1664	Alkene C=C Stretching; Ketones and Aldehydes C=O Stretching	1620-1680; 1680-1750

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

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.

Table: Performance Metrics for Random Forest, SVM, and Neural Network

Statistic	Random Forest	SVM	Neural Network
	Value (95% CI)	Value (95% CI)	Value (95% CI)
Sensitivity	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)
Specificity	100.00% (96.82% to 100.00%)	100.00% (96.82% to 100.00%)	100.00% (96.82% to 100.00%)
Positive Likelihood Ratio	26.45% (19.70% to 34.13%)	26.45% (19.70% to 34.13%)	26.45% (19.70% to 34.13%)
Negative Likelihood Ratio	0.00	0.00	0.00
Disease Prevalence	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)
Positive Predictive Value	100.00% (96.82% to 100.00%)	100.00% (96.82% to 100.00%)	100.00% (96.82% to 100.00%)
Negative Predictive Value	100.00% (97.65% to 100.00%)	100.00% (97.65% to 100.00%)	100.00% (97.65% to 100.00%)
Accuracy	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)	100.00% (91.40% to 100.00%)

Table 4: 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	Neural Network
	Value (95% CI)	Value (95% CI)	Value (95% CI)
Sensitivity	100.00% (83.16% to 100.00%)	100.00% (83.16% to 100.00%)	100.00% (83.16% to 100.00%)
Specificity	98.00% (92.96% to 99.76%)	96.00% (90.07% to 98.90%)	90.00% (82.38% to 95.10%)
Positive Likelihood Ratio	50.00 (12.68 to 197.16)	25.00 (9.57 to 65.31)	10.00 (5.55 to 18.00)
Negative Likelihood Ratio	0.00	0.00	0.00
Disease Prevalence	16.67% (10.49% to 24.56%)	16.67% (10.49% to 24.56%)	16.67% (10.49% to 24.56%)
Positive Predictive Value	90.91% (71.72% to 97.53%)	83.33% (65.68% to 92.98%)	66.67% (52.63% to 78.26%)
Negative Predictive Value	100.00% (96.31% to 100.00%)	100.00% (96.23% to 100.00%)	100.00% (95.98% to 100.00%)
Accuracy	98.33% (94.11% to 99.80%)	96.67% (91.69% to 99.08%)	91.67% (85.21% to 95.93%)

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 (ST), and in blue are the averages for the negative groups (SG, SH, SD, SE).

Figure 1A

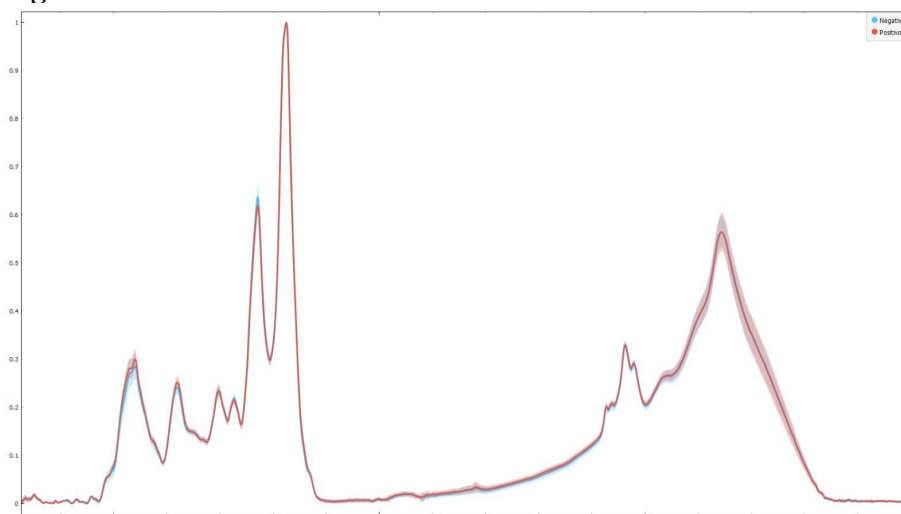


Figure 1B

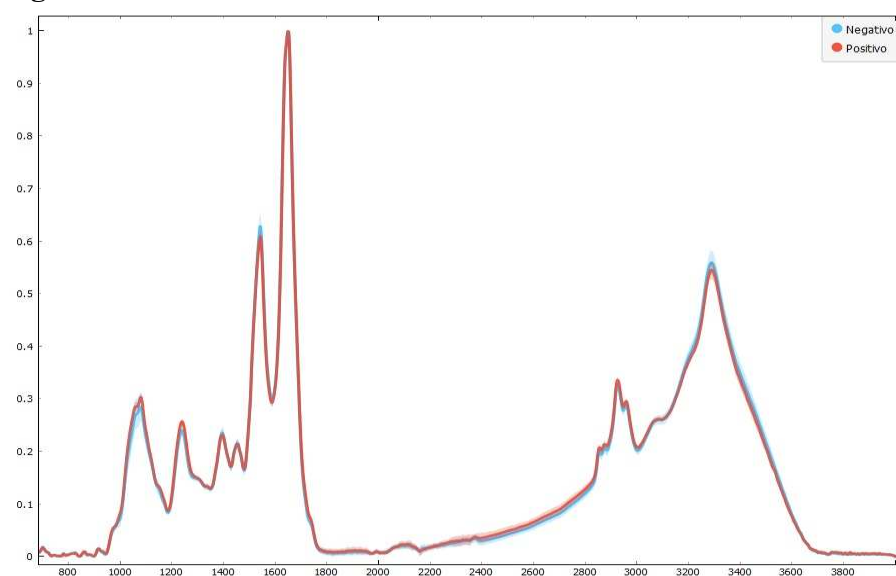
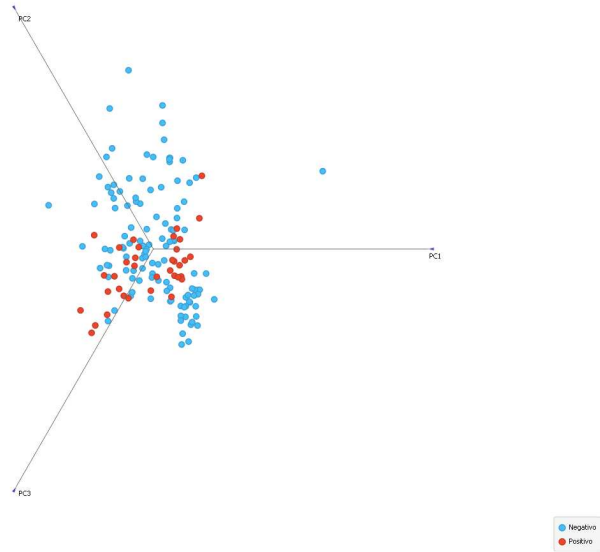


Figure 2: Graphs of principal component analysis (PCA) for training data and external validation data are presented. A) 100% explained variance was found for the training data. B) 100% explained variance was found for the external validation data. Positive samples (ST) are represented in red, and negative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

A)



B

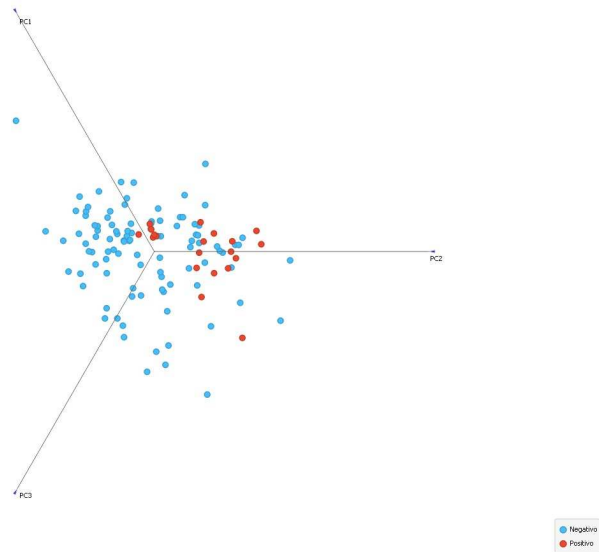
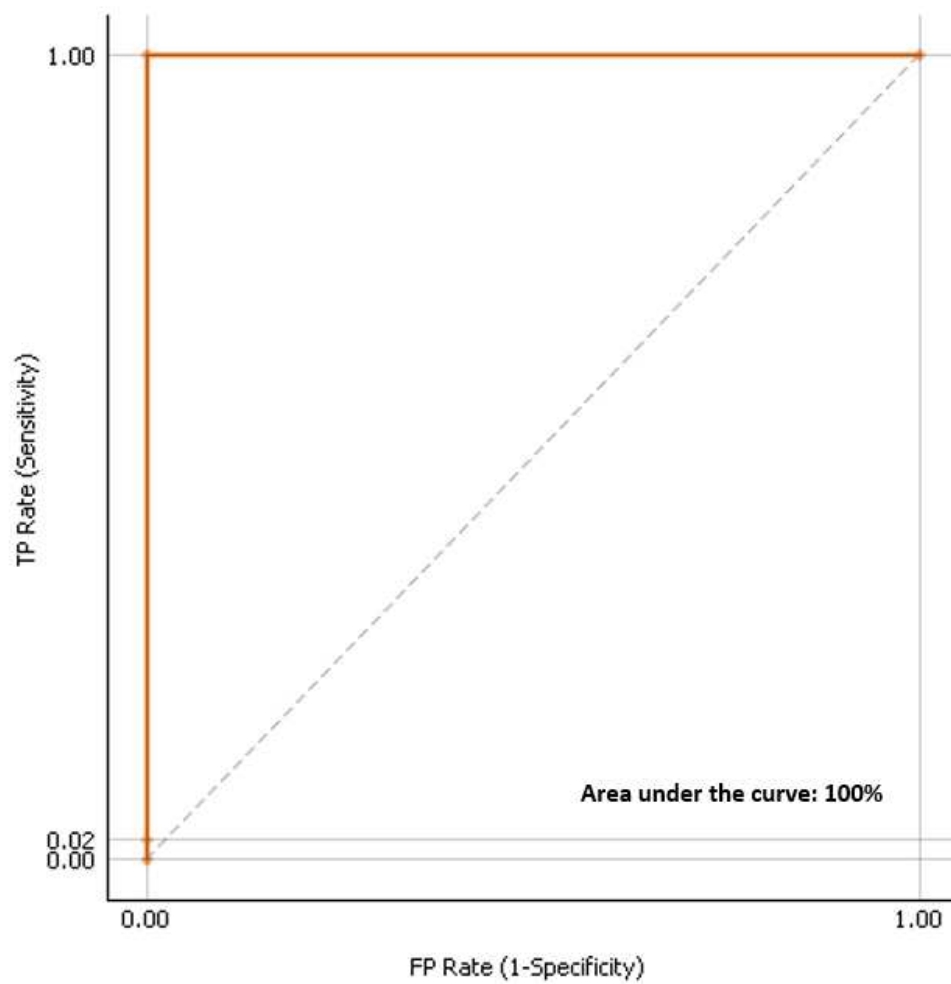
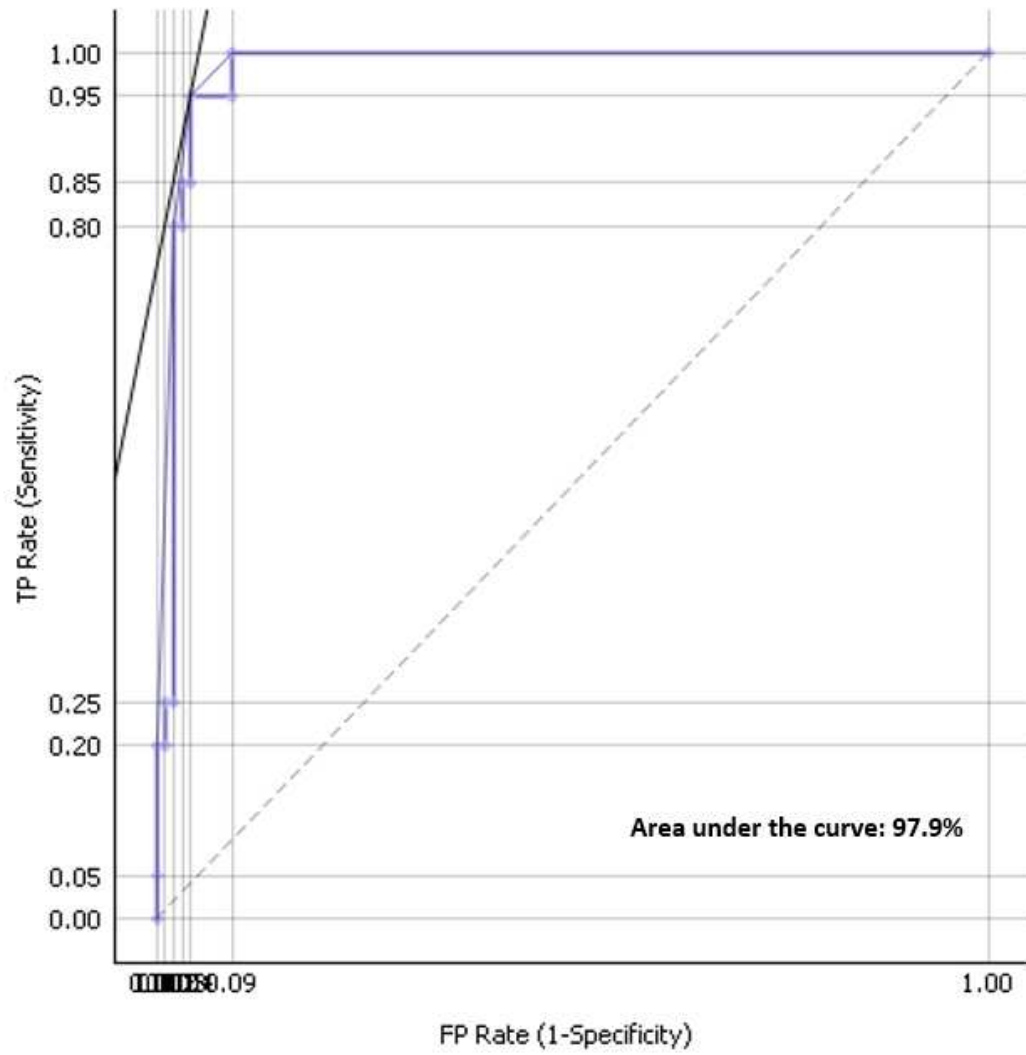


Figure 3: The area under the curve (AUCROC) values for the training data (1) external validation data (2) from the three best prediction models are presented: (A) Random Forest model result, (B) Logistic Regression result, and (C) SVM model result.

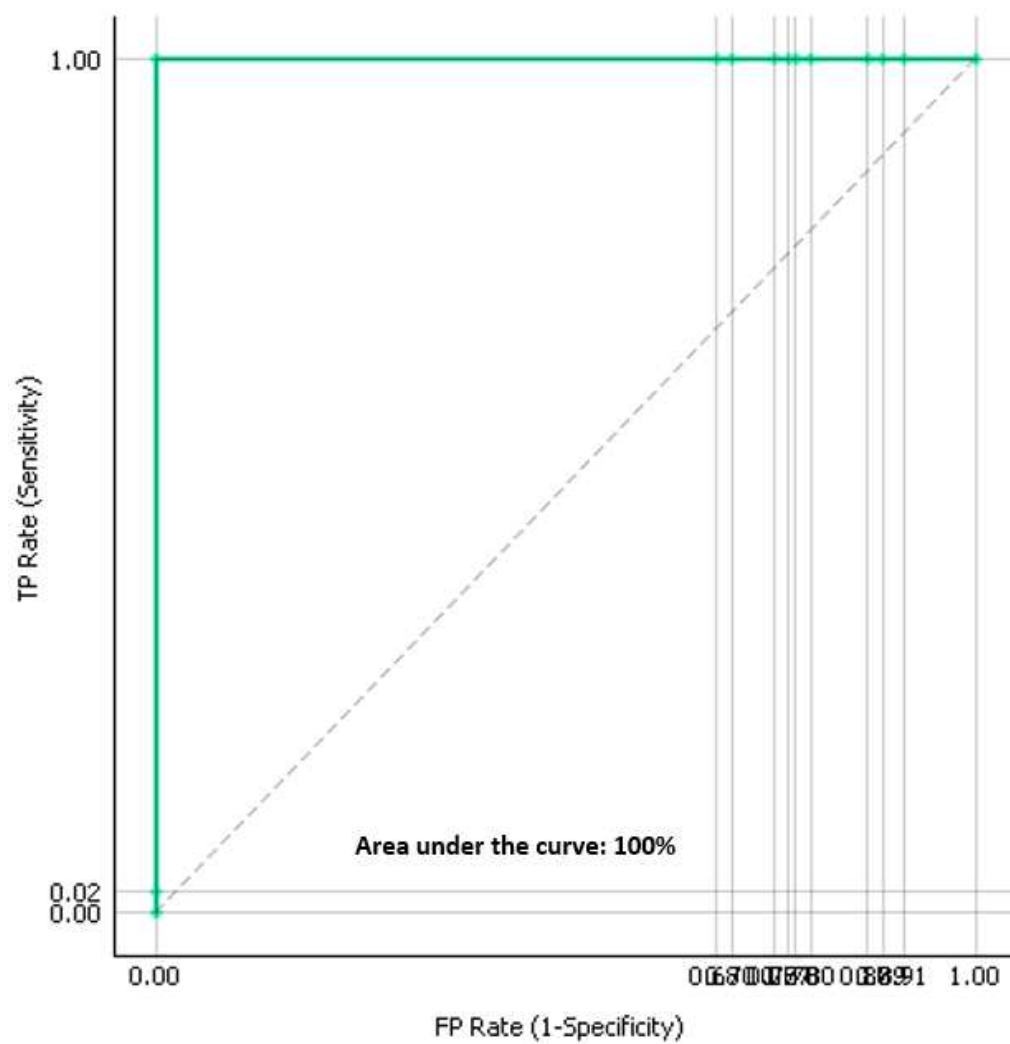
A1)



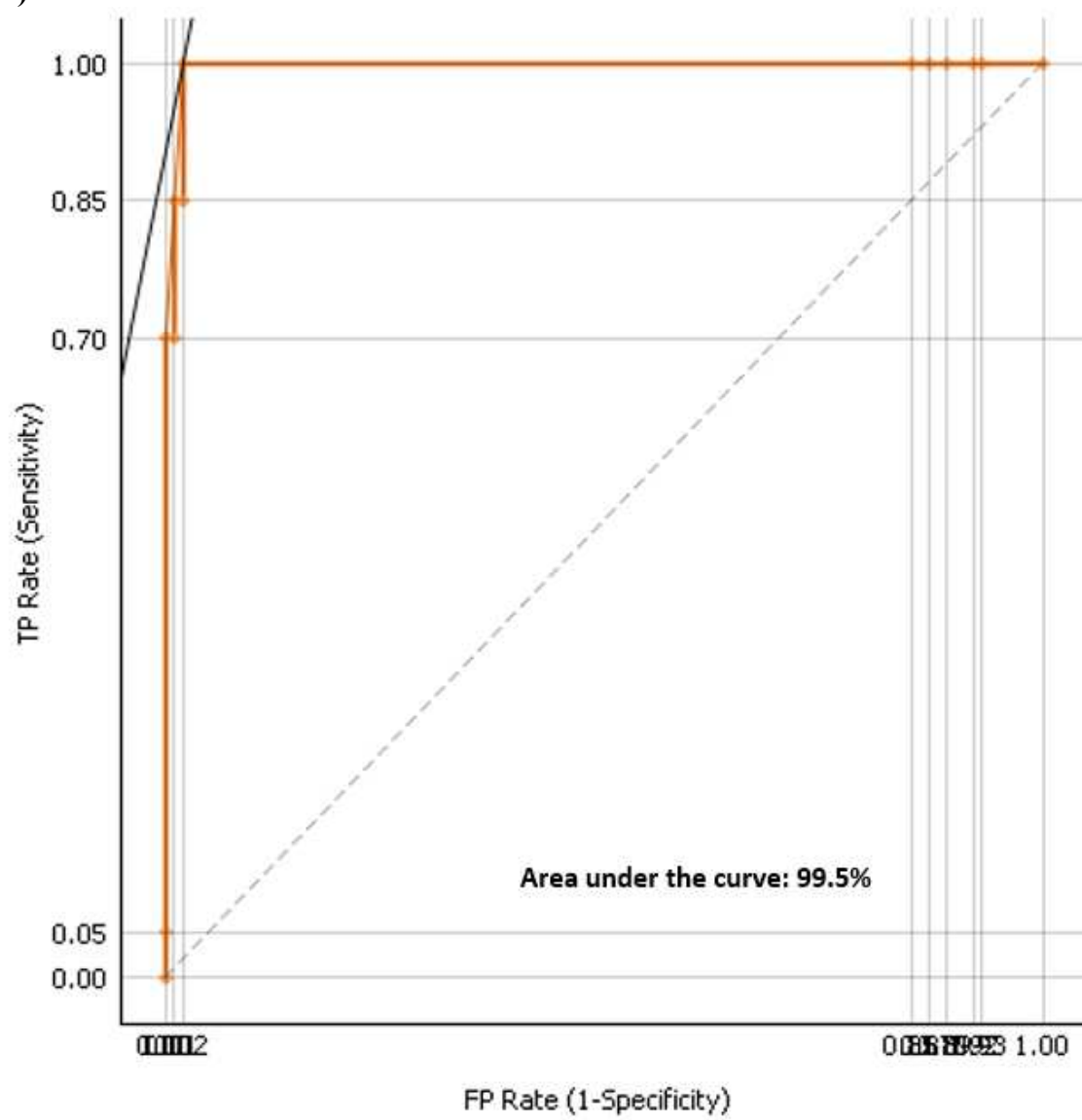
A2)



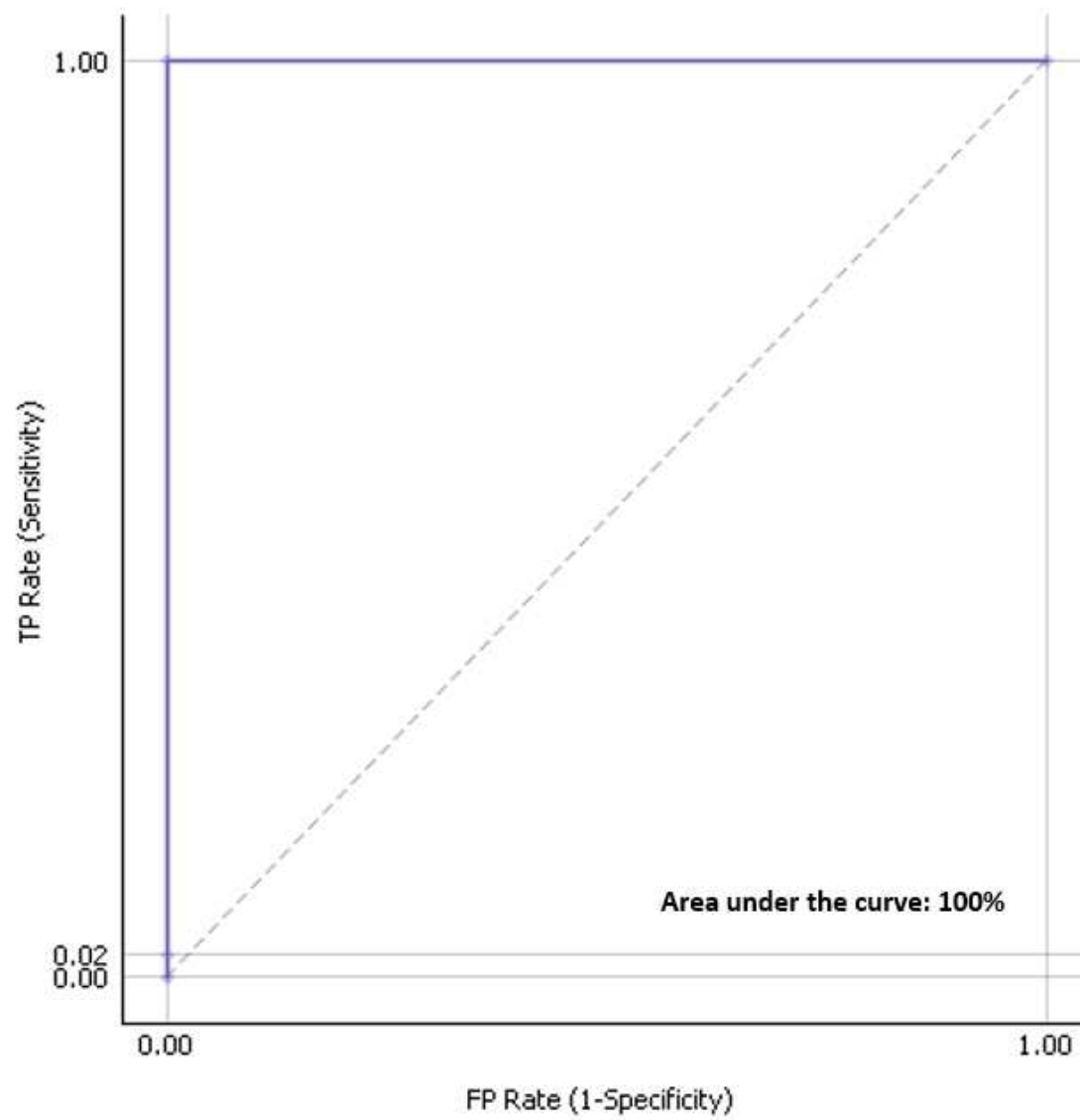
B1)



B2)



C1)



C2)

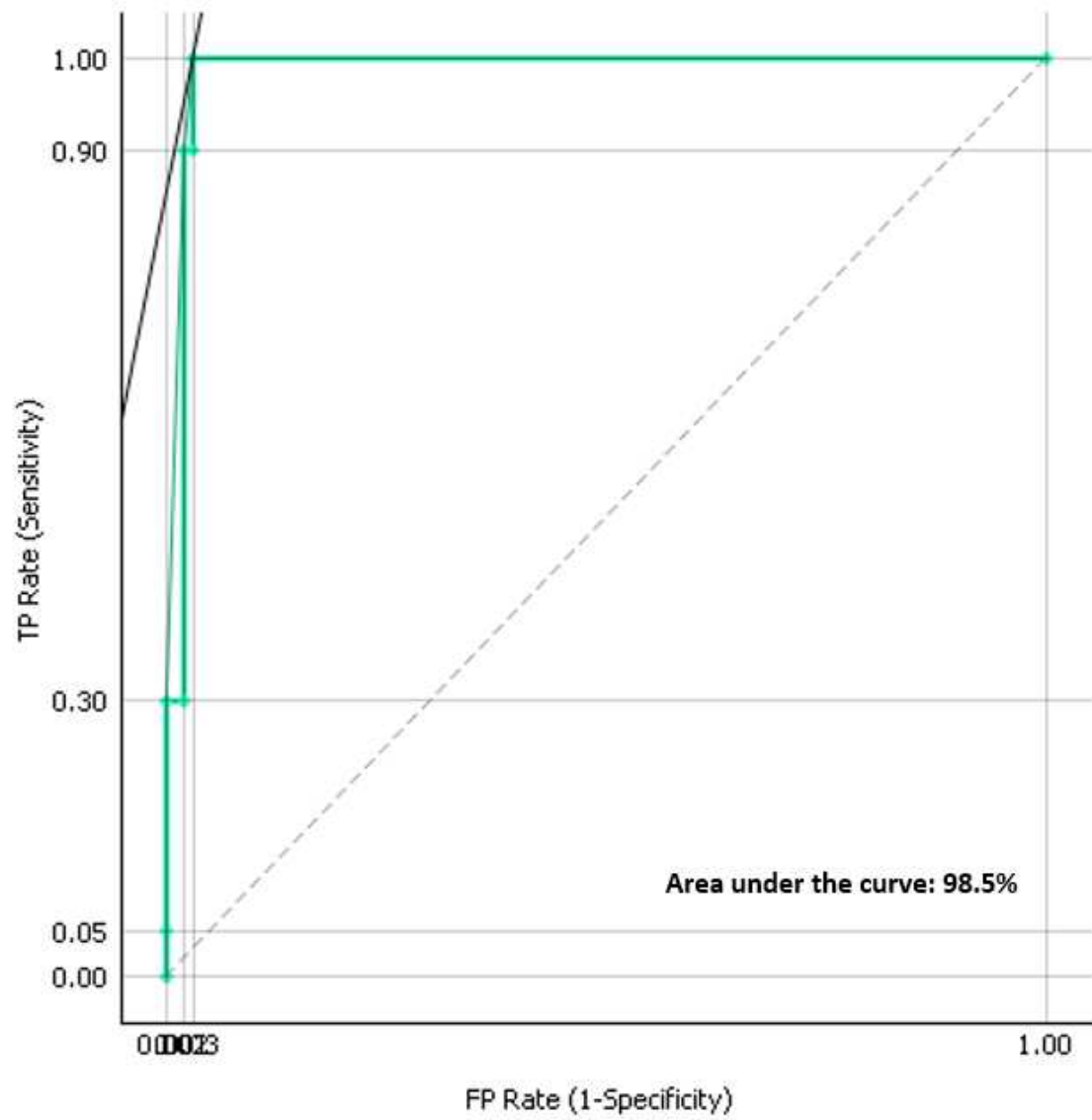


Figure 4 : The predictive performance of the Random Forest, SVM, and Logistic Regression models for the training data (A) and external validation data (B).

	A) Training data				B) External Validation			
			Predicted				Predicted	
			Negativo	Positivo			Negativo	Positivo
Actual	Negativo	114	0	114	Actual	Negativo	98	2
	Positivo	0	41	41		Positivo	0	20
Σ		114	41	155	Σ		98	22
			Predicted				Predicted	
			Negativo	Positivo			Negativo	Positivo
Actual	Negativo	114	0	114	Actual	Negativo	96	4
	Positivo	0	41	41		Positivo	0	20
Σ		114	41	155	Σ		96	24
			Predicted				Predicted	
			Negativo	Positivo			Negativo	Positivo
Actual	Negativo	114	0	114	Actual	Negativo	90	10
	Positivo	0	41	41		Positivo	0	20
Σ		114	41	155	Σ		90	30