

**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

BRENDA GONSALVES STURNICH

**Identificação de *Salmonella* spp. por Espectroscopia de
Fluorescência**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS
SETEMBRO/2020**

BRENDA GONSALVES STURNICH

**Identificação de *Salmonella* spp. por Espectroscopia de
Fluorescência**

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Kelly Cristina da Silva Brabes

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S935i Sturnich, Brenda Gonsalves

Identificação de Salmonella spp. por Espectroscopia de Fluorescência [recurso eletrônico] /
Brenda Gonsalves Sturnich. -- 2020.
Arquivo em formato pdf.

Orientadora: Dr^a. Kelly Cristina da Silva Brabes.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Federal da Grande
Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:
<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

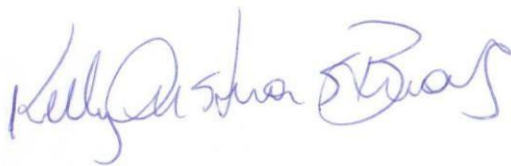
1. espectroscopia de fluorescência. 2. salmonella. 3. identificação. I. Brabes, Dr^a. Kelly Cristina
Da Silva. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

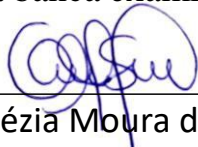
©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

Termo de Aprovação

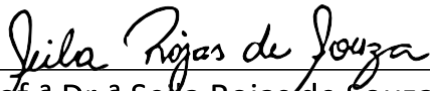
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Identificação de Salmonella spp. por Espectroscopia de Fluorescência”**, de autoria de **BRENDA GONSALVES STURNICH**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.^a Dr.^a Kelly Cristina da Silva Brabes
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Quézia Moura da Silva
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Sella Rojas de Souza
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 30 de Setembro de
2020.

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor da minha fé, meu guia, minha Estrela da Manhã. Aos meus pais, Ilma e Juvenal, e minha irmã Winnie que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me sustentar, proteger e me guiar em todo momento.

Aos meus pais por todo amor, carinho, orações, apoio e fé, que apesar de qualquer dificuldade fizeram até o impossível para me ajudar a concretizar este sonho, estando sempre presente.

A minha irmã, que com muito carinho e amor esteve sempre ao meu lado me auxiliando em tudo que precisei dentro e fora do laboratório.

A minha avó que através de seu amor, sua fé e orações foi fundamental para que eu não desanimasse.

Agradeço a minha professora e orientadora Kelly Brabes pelo empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa.

Agradeço ao Professor Dr. Fábio Juliano Negrão e a Prof.^a Dr.^a Quézia Moura da Silva por disponibilizar as cepas para as análises.

Também gostaria de deixar um agradecimento especial as técnicas dos laboratórios da FCS por disponibilizarem espaços, materiais, reagentes e agradáveis momentos neste período.

E a todos familiares, amigos e colegas que colaboraram e torceram para que todo esse projeto fosse possível.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
BHI	Brain Heart Infusion
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doença transmitida por alimento
h	Hora
Hz	Hertz
kW	Quilowatt
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
ml	Mililitro
NADH	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
nm	Nanômetro
° C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Plate Count Agar
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH	Potencial hidrogeniônico
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
λ	Comprimento de onda
$\lambda_{em/max}$	Comprimento de onda de emissão máxima
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 O espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET/UFGD).....	28
Figura 2 Espectro de emissão completo de um isolado de <i>Salmonella</i> Minnesota. $\lambda_{ex} = 280$ nm e $\lambda_{em/max} = 332$ nm.....	29
Figura 3 Espectros de diferentes cepas de <i>Salmonella</i> Minnesota e <i>Salmonella</i> Enteritidis em (a) Ágar Entérico de Hektoen, (b) Ágar Macconkey, (c) Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> e (d) Ágar TSI.....	30
Figura 4 Desenvolvimento de <i>Salmonella</i> spp. em (a) Ágar Entérico de Hektoen, (b) Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> apresentando bom crescimento e visualização de colônias e (c) desenvolvimento de <i>Salmonella</i> Minnesota em Ágar Entérico de Hektoen.....	31
Figura 5 (a) Espectro de emissão de fluorescência de <i>Salmonella</i> Enteritidis; (b) <i>Salmonella</i> Enteritidis 1, (c) <i>Salmonella</i> Enteritidis 2, (d) <i>Salmonella</i> Enteritidis 3, (e) <i>Salmonella</i> Enteritidis 4.....	33
Figura 6 (a) Espectro de emissão de fluorescência de <i>Salmonella</i> Minnesota; (b) <i>Salmonella</i> Minnesota isolado 1, (c) <i>Salmonella</i> Minnesota isolado 2.....	34
Figura 7 Análise multivariada obtida por PCA através dos espectros de emissão de fluorescência de <i>Salmonella</i> Minnesota e <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	35

RESUMO

As Salmonelas são os principais agentes etiológicos de DTAs no mundo, responsáveis por milhões de doenças diarreicas e milhares de mortes por ano. Apesar de ser uma espécie vastamente conhecida, o processo para confirmação desta como o causador de DTA é lento e de alto custo econômico. Para se confirmar o diagnóstico é feito o isolamento do micro-organismo em meio de cultura e teste de caracterização bioquímica, porém estes procedimentos demoram 15 dias de acordo com as normas estabelecidas pela Anvisa. Compreendendo a importância de diminuir o tempo de resposta de métodos convencionais, avaliou-se isolados de salmonela em espectrofluorímetro. As cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Minnesota foram inoculadas em diversos ágar (Ágar *Salmonella-Shigella*, Entérico de Hektoen, Macconkey, e Três Açúcares e Ferro); após o período de inoculação, suas colônias foram diluídas em solução salina 0,9% e, para obtenção de seus espectros de emissão, foram analisadas no espectrofluorímetro com excitação em comprimento de onda a 280 nm, abrangendo a região espectral de comprimento de onda 200 a 700 nm. Com a obtenção dos espectros, concluiu-se que o Ágar Entérico de Hektoen possui melhor desempenho para a análise. Ainda, constatou-se que há diferença no comprimento de onda de emissão dos sorotipos, em que *Salmonella* Enteritidis apresentaram $\lambda_{em/max} = 336$ nm e as cepas de *Salmonella* Minnesota apresentaram $\lambda_{em/max} = 332$ nm.

ABSTRACT

Salmonella are the main etiological agents of DTAs in the world, responsible for millions of diarrheal diseases and thousands of deaths per year. Despite being a widely known species, the process for confirming it as the cause of ATD is slow and of high economic cost. In order to confirm the diagnosis, the micro-organism is isolated in a culture medium and biochemical characterization test, however these procedures take 15 days according to the rules established by Anvisa. Understanding the importance of reducing the response time of conventional methods, salmonella isolates were evaluated in a spectrofluorimeter. The strains of Salmonella Enteritidis and Salmonella Minnesota were inoculated on several agars (Salmonella-Shigella Agar, Hektoen Enteric, Macconkey, and Three Sugars and Iron); after the inoculation period, their colonies were diluted in 0.9% saline solution and, to obtain their emission spectra, they were analyzed in the spectrofluorimeter with wavelength excitation at 280 nm, covering the 200 wavelength spectral region at 700 nm. With the acquisition of spectra, it was concluded that Hektoen's Enteric Agar has better performance for the analysis. Still, it was found that there is a difference in the emission wavelength of serotypes, in which Salmonella Enteritidis presented $\lambda_{em/max} = 336$ nm and the strains of Salmonella Minnesota presented $\lambda_{em/max} = 332$ nm.

Sumário

CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Salmonela	14
2.1.1 Métodos de identificação de <i>Salmonella</i> spp	15
2.2 Espectroscopia de Fluorescência	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
4 REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO II	26
5 INTRODUÇÃO	26
6 MATERIAIS E MÉTODOS	27
6.1 Obtenção dos isolados de <i>Salmonella</i> Minnesota e <i>Salmonella</i> Enteritidis ...	27
6.2 Preparo da amostra	27
6.3 Análise Espectroscópica de Fluorescência	28
7 RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
7.1 Análise Espectroscópica de Fluorescência	29
8 CONCLUSÃO	36
9 REFERÊNCIAS	36
CAPÍTULO III	39
Normas para publicação do artigo	39
Artigo Científico	40
ANEXOS	48

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), por ano quase 600 milhões de pessoas são acometidas de alguma doença transmitida por alimento (DTA) e cerca de 420 mil morrem por ingerir comida contaminada (WHO, 2020). Um dos agentes patogênicos responsáveis e mais comum por gastroenterite em humanos é a *Salmonella* spp, causando sérios problemas em saúde pública e grandes gastos econômicos em diversos países. A contaminação está associada a ingestão de alimentos como carne de aves e suínos, ovos e também de fontes como vegetais e água (WHO, 2020).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2009 a 2018, foram notificados 6903 surtos de DTAs, representando 672873 pessoas expostas a alimentos contaminados causando 99 óbitos, sendo 90% deles provocados por bactérias. A *Salmonella* spp foi o segundo agente mais prevalente, responsável por 11,2% dos surtos (BRASIL, 2019). Nos últimos anos no Brasil houve uma diminuição no número de casos de infecções em humanos, porém o número de isolados de origem alimentar e ambiental aumentou significativamente (BRASIL, 2018). A situação é mais agravante quando observado a elevada taxa de resistência aos medicamentos por essas bactérias. O uso inadequado de antibióticos em animais de produção e o recorrente uso em humanos, tem selecionado bactérias resistentes. Esta crescente, contribui para o estabelecimento de formas invasivas da infecção e dificulta o tratamento, elevando a morbidade e mortalidade (WHO, 2018; GANGATHRAPRABHU et al, 2020).

Nesse âmbito, é importante a adoção de novas medidas, não só de tratamento, mas de controle e de técnicas mais rápidas de caracterização, visando respostas rápidas e eficazes para possíveis surtos (GANGATHRAPRABHU et al, 2020). A Espectroscopia de Fluorescência tem recebido cada vez maior atenção para monitoramento e caracterização devido à alta seletividade e sensibilidade. A técnica se demonstra atrativa por sua rapidez e por utilizar pequeno volume de amostra. Estudos demonstram a capacidade da espectroscopia de fluorescência em analisar amostras com material celular (vivo ou morto), matéria orgânica e microbiológica (CARSTEAN et al, 2020; JONES; BRIDGEMAN, 2019; BRIDGEMAN et al, 2011).

Uma metodologia alternativa com Espectroscopia de Fluorescência para identificação de micro-organismo como a *Salmonella* spp é de grande utilidade pois reduziria custos e tempo de metodologias atuais ou complementares mais complexas, proporcionando rápida resposta melhorando a eficiência de tratamento e diminuindo o uso não seletivo de antibióticos. Com a implementação da técnica, ações corretivas poderão ser realizadas imediatamente em caso de eventuais surtos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Salmonela

Aproximadamente, existem 200 tipos de doenças alimentares, dentre elas muitas são decorrentes à contaminação por micro-organismos. Os problemas resultantes causados pela ingestão de alimentos contaminados por esses micro-organismos são denominados como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (WHO, 2020; CDC, 2006). Nas últimas décadas a incidência de morbidade e mortalidade relacionadas as DTAs têm aumentado, cerca de 550 milhões de pessoas adoecem a cada ano, incluindo 230 milhões de crianças com menos de 5 anos, caracterizando-se como um sério problema de saúde pública (WHO, 2020).

Dentre os principais causadores destas doenças, estão as salmonelas as quais são responsáveis por milhões de doenças diarreicas e milhares de mortes por ano em todo mundo. Além disso, causa doenças em animais acarretando diminuição na produção, gerando grande preocupação e prejuízo econômico (CHOIA, 2020; LEE et al, 2015). Entre as doenças relacionadas a *Salmonella* spp. duas são de maior importância: gastroenterite, geralmente causada pelos sorotipos Typhimurium e Enteritidis (porém outros sorotipos podem ser responsáveis pela contaminação) e febre tifoide, que tem como agente causador o sorovar Typhi (GANGATHRAPRABHU et al, 2020; WHO, 2018; SABBAGH, 2013). A contaminação humana ocorre principalmente por via oral através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Outros fatores como armazenamento, temperatura, cozimento inadequados e falta de higiene pessoal podem provocar a contaminação (WHO, 2020; DOUGNON et al, 2017).

A sorotipagem é um componente essencial para vigilância epidemiológica e para a investigação de surtos de Salmonelose (WHO, 2018). Atualmente mais de 2600 sorotipos de *Salmonella* estão listados no centro colaborador da OMS para referência e pesquisa sobre *Salmonella*, Institut Pasteur (DOUGNON et al, 2017; DCD, 2019).

As salmonelas são bacilos Gram negativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae, geralmente móveis (quando há flagelos peritríqueos), não formadores de esporos (CHEN, 2020; PARIJA, 2009). Comparados com outras espécies, as salmonelas são altamente resistentes a fatores ambientais, pois podem adquirir adaptabilidade fisiológica (RADKOWSKI, 2002), podendo sobreviver não apenas em condições ideais de 37° C e pH entre 6 e 8, mas em extremos de 2°C a 90°C (SHACHAR

et al, 2006) e pH 2,3 a 9,5 (MOAT et al, 2002). O gênero *Salmonella* é oxidase negativa, catalase positiva e reduz nitrato a nitrito. Capazes de fermentarem glicose produzindo ácido e gás H₂S, não fermentam a lactose e sacarose, não hidrolisam ureia e descarboxilam lisina e ornitina. A maior parte dos sorotipos utiliza o citrato como fonte de carbono (CHEN, 2020; CHOIA, 2020; SILVA et al, 2007).

Alguns sorotipos de salmonela possuem hospedeiro específico, como *S. Gallinarum*, que provoca doença apenas em aves, enquanto outros, como *S. Typhimurium*, ocasionam infecções em diferentes espécies animais, roedores, suínos, ovinos, aves, bovinos e seres humanos, podendo causar diferentes doenças como febre tifoide, septicemia, infecções localizadas em vários tecidos corporais e enterite (WHO, 2018; GANGATHRAPRABHU et al, 2020). Os sorovares Enteritidis e Typhimurium são respectivamente a primeira e segunda maior causa de Salmonelose, frequentemente relacionados a doenças em humanos e animais (GANGATHRAPRABHU et al, 2020; BISHOP et al, 2011). Porém há uma crescente preocupação com outros sorotipos como Heidelberg, Infantis e Minnesota (VOSS-RECH et al, 2011). Em amostras de aviários de frangos de corte no Brasil, encontrou 20 sorotipos com a maior prevalência do sorovar Minnesota em 37,93% das amostras. (LOURENÇO, et al, 2013). Estudo de CAMPOS et al. (2016) também demonstra crescimento no número de contaminações em carnes de frango pelo sorotipo Minnesota na Europa.

As salmonelas estão se tornando mais resistentes a antibióticos, dificultando o tratamento de infecções graves (DCD, 2019). A existência de cepas multirresistentes implica no tratamento de quadros clínicos associados a surtos de DTA. Em isolados de carcaças congeladas no Brasil, 76,8% das cepas foram classificadas como multirresistentes, ou seja, apresentando resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (BRASIL, 2012).

2.1.1 Métodos de identificação de *Salmonella* spp

A espécie salmonela apresenta bom crescimento em meios para enterobactérias, mas é importante que sejam utilizados meios seletivos específicos. Para o isolamento em meios sólidos utilizam-se, principalmente, os ágar Verde-brilhante, Xilose-Lisina-Desoxicolato, Hektoen, Salmonella-Shigella e Manitol-Lisina (BRASIL, 2011; MALLINSON, 1989). Com as colônias de salmonela podem apresentar características

bem próximas de outros gêneros de enterobactérias, é essencial a caracterização bioquímica da cepa (MARIETTO-GONÇALVES, 2010).

Para a confirmação de presença de *Salmonella*, segue-se quatro etapas básicas: pré-enriquecimento, enriquecimento, isolamento e identificação bioquímica. O pré-enriquecimento é uma etapa não seletiva que utiliza meio de cultura líquido para que as bactérias recuperem sua potencialidade após incubação por 24 horas. A etapa de enriquecimento também se utiliza meio de cultura líquido e incubação por 24 horas. Esta visa minimizar o crescimento de outras bactérias que podem estar presentes na amostra, mas principalmente, melhorar o crescimento seletivo de *Salmonella* (BEZERRA, 2019; DOUGNON et al, 2017).

Para o isolamento é utilizado meios de cultura sólidos em placas de Petri. O meio contém uma variedade de fatores seletivos para o desenvolvimento de colônias específicas (DOUGNON et al, 2017). A salmonela tem crescimento habitual de 24 horas de incubação em meios seletivo, como por exemplo em Ágar Hektoen. Neste meio, as colônias de salmonela se diferem das demais, pois ocorre mudança da coloração do meio para verde onde as colônias da bactéria crescem. As colônias são lisas, convexa, circular, brilhante e com centro negro devido à produção de H₂S (GONÇALVES, 2016).

Na identificação bioquímica pode ser utilizados diversos testes tais como presença de catalase, teste de motilidade e fermentação de glicose. Além das etapas básicas, são feitos outros métodos para a identificação de presença de *Salmonella* spp. Estes incluem sorotipagem, métodos de diagnósticos moleculares, que são baseados na análise total do DNA, DNA cromossômico ou plasmídeo; ribotipagem, que permite determinar as relações filogenéticas entre linhagens da mesma espécie; ensaio de hibridização com sonda de DNA; sequenciação de genoma (WGS); e espectroscopia de massa MALDI-TOF, a análise consiste em que a amostra a ser analisada é misturada com uma substância matriz. A mistura é disposta em uma lâmina que é colocada no aparelho e irradiada por laser. A matriz ao absorver a luz do laser vaporiza a amostra obtendo a ionização de várias moléculas. Os campos elétricos guiam os íons no espectrômetro de massa que os separará conforme o tempo e chagada ao detector. O resultado é dado em espectros correspondentes aos diferentes fragmentos da molécula original, que será possível deduzir a estrutura em uma base de dados computadorizada, permitindo a identificação precisa da espécie presente (DOUGNON et al, 2017; PASTERNAK, 2012).

2.2 Espectroscopia de Fluorescência

As interações da luz com a matéria são fortemente dependentes do comprimento de onda da luz e a resposta do alvo a essa luz. As principais interações incluem espalhamento, absorção e fluorescência (LEVITUS, 2020). Luminescência é um termo geral para a emissão de radiação, que incorpora tanto fluorescência (um processo de curta duração) e fosforescência (um processo de longa duração), bem como outros fenômenos como bioluminescência em organismos vivos em que as reações químicas geram luz (LEVITUS, 2020; SHAKIBAIE et al, 2018). A fluorescência é um fenômeno óptico que ocorre em uma molécula após a absorção de energia luminosa, onde os fótons absorvidos elevam a energia eletrônica da molécula a estados quânticos excitados e menos estáveis, e ao retornar para seu estado fundamental devolvem ao meio energia em forma de luz, que são fótons emitidos, desta forma a absorção de luz de um determinado comprimento de onda resulta na emissão de luz de um comprimento de onda mais longo (LEVITUS, 2020 ; MARKECHOVÁ et al, 2013; ATKINS, 2004).

Quando a luz é absorvida, o elétron torna-se eletronicamente excitado, mas o tempo de vida no estado excitado é muito curto, e há um rápido decaimento para um nível de energia inferior. Para obter maior estabilidade, a molécula dissipa energia absorvida por decaimento radioativo, que envolvem a emissão de fótons (LEVITUS, 2020; LERNER et al, 2018). Na fluorescência o processo de decaimento demora nanossegundos, sendo derivado de níveis de energia no estado singleto. Devida a estas características, a fluorescência é caracterizada como uma assinatura molecular (LAKOWICZ, 2006; ATKINS, 2004). Estas assinaturas moleculares, podem ser traduzidas através de espectrofluorímetros que tem a finalidade de determinar os chamados espectros eletrônicos de emissão. O instrumento permite que se registre os sinais de intensidade de emissão em cada comprimento de onda, conhecidos como espectro de emissão (ATVARS, 2002).

Estudos com a técnica de espectroscopia de fluorescência demonstram eficiência em monitorar águas residuais e, a partir destes, percebeu-se uma alta sensibilidade da técnica em relação a componentes como material celular e microbiológico, que apresentaram comprimento de onda de emissão entre 340 a 381 nm quando excitados a 275 nm (CARSTEAN et al, 2020; CARSTEAN, 2016; BRIDGEMAN et al, 2011). Nesta mesma linha, outro estudo propôs que é possível obter espectros diferentes para diversificadas espécies a partir de colônias em ágar. Destacando que quando a amostra é

excitada em 280 nm sua emissão corresponde a região do triptofano e quando excitada a 380 nm, corresponde ao NADH das bactérias. Sendo o triptofano e NADH responsáveis para auxiliar na identificação de uma espécie. Destacando ainda que o método é simples, sensível e de baixo custo comparados a técnicas atuais como MALDI-TOF (AWAD, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a técnica de Espectroscopia de Fluorescência como alternativa para identificação de isolados de *Salmonella* determinando a faixa dos comprimentos de onda como forma de identificação de espécies bacterianas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a faixa espectral dos isolados de *Salmonella* spp;
- Determinar melhor meio de cultura para a utilização da técnica: Ágar *Salmonella-Shigella*, Entérico de Hektoen, Macconkey, ou Três Açúcares e Ferro (TSI);
- Identificar o comprimento de onda em espectros de emissão para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Minnesota.

4 REFERÊNCIAS

ATVARS, T. D. Z; MARTELLI, Cláudia. Espectroscopia eletrônica de emissão. **Chemkeys**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 1-7, fev./2002. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2002/02/18/espectroscopia-eletronica-de-emissao/>>. Acesso em: 29 out. 2019.

AWAD, F. et al. Optical Fiber-Based Steady State and Fluorescence Lifetime Spectroscopy for Rapid Identification and Classification of Bacterial Pathogens Directly from Colonies on Agar Plates. **International Scholarly Research Notices**. Índia, v. 2014, set./2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2014/430412/>. Acesso em: 9 mar. 2020.

BEZERRA, J. B. et al. Identificação de *Salmonella* spp. na carne bovina moída comercializada em municípios do Vale do Guaribas, no Estado do Piauí. **The Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 8, n. 12, p. 1-12, out./2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v8i12.1696>. Acesso em: 3 ago. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2012. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**. Brasília. 171 p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395481/Relat%C3%B3rio+Prebaf+-+Programa+Nacional+de+Monitoramento+da+Preval%C3%Aancia+e+da+Resist%C3%Aancia+Bacteriana+em+Frango/f6bb5296-e633-4f7b-b81f-48a99430da6a> . Acesso em: 12 janeiro 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 1-64, dez./2011. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 1 maio. 2019.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde Departamento De Vigilância Das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral De Doenças Transmissíveis. 2018. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em:

<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2020.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde Departamento De Vigilância Das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral De Doenças Transmissíveis. 2019. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2020.

BRIDGEMAN, J.; BIEROZA, M.; BAKER, A. The application of fluorescence spectroscopy to organic matter characterisation in drinking water treatment. **Environ Sci Biotechnol**, 10:277-290. 2011.

CAMPOS, J. et al. Clinical *Salmonella* Typhimurium ST34 with metal tolerance genes and an IncHI2 plasmid carrying oqxAB-aac(6?)-Ib-cr from Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Porto, Portugal, v. 71, n. 3, p. 843-845, mar./2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/71/3/843/2364246>>. Acesso em: 9 jan. 2020.

CARSTEAN, E. M. et al. In situ fluorescence measurements of dissolved organic matter: A review. **Science of the Total Environment**, Sydney, v. 699, n. 1, p. 1-16, jan./2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719343529?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

CARSTEAN, E. M.; BRIDGEMAN, J.; BAKER, A.; REYNOLDS, D. M. Fluorescence spectroscopy for wastewater monitoring: A review. **Water Research**, 95:205-219. 2016.

CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019

CHEN, Jinru; WANG, Yin. Genetic determinants of *Salmonella enterica* critical for attachment and biofilm formation. **International Journal of Food Microbiology**, Georgia, v. 320, n. 1, p. 1-8, jan./2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108524>. Acesso em: 6 jul. 2020.

CHOIA, Eongjoon; GROISMANA, Eduardo A.. *Salmonella* expresses foreign genes during infection by degrading their silencer. **PNAS**, Bethesda, v. 117, n. 14, p. 1-9,

abr./2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/PNAS.1912808117>. Acesso em: 29 mai. 2020.

DOUGNON, Tamègnon Victorien; LEGBA, Boris; DEGUENON, Esther. Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of *Salmonella* species: A Review . **Notulae Scientia Biologicae**, Cotonou, Benin, v. 9, n. 4, p. 466-472, nov./2017.

GANGATHRAPRABHU, B. et al. A review on the origin of multidrug-resistant *Salmonella* and perspective of tailored *phoP* gene towards avirulence. **Microbial Pathogenesis**, India, v. 147, n. 1, p. 1-12, jun./2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088240102030718X?via%3DiHub>. Acesso em: 31 jul. 2020.

GONÇALVES, G. A. M. Boletim Técnico ABRAVAS: Diagnóstico para *Salmonella enterica* na clínica de aves de estimação. 5. ed. Brasil: **Associação Brasileira de Veterinários de Animais Selvagens - ABRAVAS**, 2016. p. 1-12.

JONES, Alfred Ndahi; BRIDGEMAN, John. A fluorescence-based assessment of the fate of organic matter in water treated using crude/purified Hibiscus seeds as coagulant in drinking water treatment. **Science of the Total Environment**, West Yorkshire, v. 646, p. 1-10, jan./2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718327591?via%3DiHub>. Acesso em: 8 jan. 2020.

KRAMER, S. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences.. **Infection and Immunity**, Texas, v. 69, n. 5, p. 2894-2901, mai./2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98240/pdf/ii002894.pdf> >. Acesso em: 6 nov. 2019.

LEE, K. et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015.

LERNER, E. et al. Toward dynamic structural biology: Two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer. **Science**, Los Angeles, v. 359, n. 1, p. 1-12, jan./2018. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/359/6373/eaan1133/tab-pdf>. Acesso em: 3 mai. 2020.

LEVITUS, Marcia. Tutorial: measurement of fluorescence spectra and determination of relative fluorescence quantum yields of transparent samples. **Methods and Applications in Fluorescence**, Tempe, v. 8, n. 3, p. 1-22, abr./2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7e10>. Acesso em: 10 jun. 2020.

LOURENÇO, M. C. et al. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 11-14, jan./2013.

RADKOWSKI, M. Effect of Moisture and Temperature on Survival of *Salmonella* Enteritidis on Shell Eggs. *Archive Geflügelk*, v. 66, n. 3, p. 119-123, 2002.

MALLINSON, Snoeyenbos GH. Salmonellosis. In: Chairman HGP, Arp LH, Domermuth CH, Pearson JE. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 3^a ed. Kennet Square: American Association of Avian Pathologists; 1989. p.3-11.

MARIETTO-GONÇALVES, Almeida SM, Lima ET, Okamoto AS, Pinczowski P, Andreatti Filho RL. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in bluefronted Amazon parrot (*Amazona aestiva*). *Avian Dis.* 2010; 54: 151-155.

MARKECHOVÁ, Diana; TOMKOVÁ, Michaela; SÁDECKÁ, Jana. Fluorescence Excitation-Emission Matrix Spectroscopy and Parallel Factor Analysis in Drinking Water Treatment: A Review. **Polish Journal of Environmental Studies**, Bratislava, v. 22, n. 5, p. 1289-1295, mai./2013. Disponível em: <http://search-ebshost-com.ez50.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=90555665&lang=pt-br&site=ehost-live>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. Microbial Stress Responses. *Microbial Physiology*. New York: Wiley-Liss, 2002. p. 582-611.

MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT (MMWR). **Centers for Disease Control and Prevention, - CDC - Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States**, 1998-2002. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/PDF/ss/ss5510.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2019.

PARIJA, Subhash Chandra. **Textbook of Microbiology and Immunology: Salmonella**. 1. ed. Haryana: Elsevier, 2009. p. 279-291.

PASTERNAK, Jacyr. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. **Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein**: subtítulo da revista, São Paulo, v. 10, n. 1, mar./2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026> . Acesso em: 3 mar. 2020.

SABBAGH, Sebastien. Identification et caractérisation de gènes chez Salmonella enterica sérovar Typhi impliqués dans l'interaction avec les macrophages humains. **Université de Montréal. Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales**, Montreal, jul./2013.

SALIPANTE, S. J. et al. Application of Whole-Genome Sequencing for Bacterial Strain Typing in Molecular Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 53, n. 4, p. 1072-1079, jan./2015. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/53/4/1072.full.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2020.

SENIOR, K. Estimating the Global Burden of Foodborne Disease. **The Lancet Infectious Diseases**, Inglaterra, v. 9, n. 2, p. 80-81, fev./2009.

SHACHAR, D.; YARON, S. Heat Tolerance of *Salmonella enterica* Serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in Peanut Butter. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2687-2691, 2006.

SHAKIBAIE, Fardad; LAMARD, Laurent; RUBINSZTEIN-DUNLOP, Halina; WALSH, Laurence J. (February 23rd 2018). Application of Fluorescence Spectroscopy for Microbial Detection to Enhance Clinical Investigations, **Photon Counting - Fundamentals and Applications**, Nikolay Britun and Anton Nikiforov, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.73616. Available from: <https://www.intechopen.com/books/photon-counting-fundamentals-and-applications/application-of-fluorescence-spectroscopy-for-microbial-detection-to-enhance-clinical-investigations>.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ª Edição. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, Quézia Moura Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros / Quézia Moura Silva. Dourados, MS: **UFGD**, 2012. 97f. il.

SOHN, M. et al. Fluorescence Spectroscopy for Rapid Detection and Classification of Bacterial Pathogens. **Applied Spectroscopy**, Georgia, v. 63, n. 11, p. 1251-1255, nov./2009. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1366/000370209789806993>>. Acesso em: 29 out. 2019.

THONG, K. L. et al. Genetic Diversity of Clinical and Environmental Strains of *Salmonella enterica* Serotype Weltevreden Isolated in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, University of Malaya, v. 40, n. 7, p. 2498-2503, jun./2002. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/40/7/2498>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

VOSS-RECH, D. et al. Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* spp. Isoladas de aviários de frangos de corte no Brasil entre 2009 e 2010. **ANAIS Conferência Facta De Ciência E Tecnologia Avícolas**. Santos, SP, fev./2011.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug Resistant *Salmonella***. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 17 nov. 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 19 maio 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory Protocol “Isolation of *Salmonella* spp. from Food and Animal Faeces”**. 2010. Disponível em: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/isolation_of_salm_220610.pdf. Acesso em: 17 nov. 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. ***Salmonella* (non-typhoidal)**. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 10 mar. 2020.

CAPÍTULO II

5 INTRODUÇÃO

Entre as doenças transmitidas por alimentos as causadas pela bactéria *Salmonella* spp. é de grande importância por ser a segunda com maior incidência de contaminação. A contaminação humana ocorre principalmente por via oral através da ingestão de água ou alimentos contaminados, ocasionando diferentes doenças como febre tifoide, septicemia, infecções localizadas em vários tecidos corporais e enterite (WHO, 2018; GANGATHRAPRABHU et al, 2020). Outros fatores como armazenamento, temperatura, cozimento inadequados e falta de higiene pessoal podem provocar a contaminação (WHO, 2020; DOUGNON et al, 2017).

A preocupação global de doenças transmitidas por alimentos, particularmente causadas pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias, requer técnicas de monitoramento e detecção rápidas. A metodologia atual de cultura bacteriana é demorada; para isolamento e identificação da espécie a avaliação adotada atualmente requer um período de aproximadamente 15 dias (EL-TABONI et al, 2020; BRASIL, 2011). Portanto, há uma necessidade de desenvolvimento de técnicas mais diretas, rápidas e sensíveis para detecção de patógenos bacterianos, principalmente de alimentos que por ano causa milhões de contaminações e cerca de 420 mil mortes no mundo pela ingestão de alimentos contaminados (GANGATHRAPRABHU et al, 2020; WHO, 2020).

Em busca de um método rápido, conveniente e econômico para o monitoramento microbiológico, incluindo o monitoramento de segurança alimentar, saúde pública e ambiental, estudos com a espectroscopia de fluorescência estão sendo cada vez mais realizados (CARSTEAN et al, 2020; EL-TABONI et al, 2020). A espectroscopia de fluorescência possui um valor significativo para a avaliação laboratorial de materiais complexos e misturas, despertando interesse de sua utilização como método alternativo para identificar e diferenciar bactérias em aplicações clínicas e alimentares (SHAKIBAIE et al, 2018).

Considerando a importância de diagnóstico rápido para DTAs e surtos causados por alimentos esta pesquisa tem por objetivo determinar a faixa espectral de emissão da espécie *Salmonella* spp. e diferenciar o comprimento de onda de emissão para *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Minnesota. Com o avanço da técnica na área, a metodologia

auxiliaria profissionais na área da saúde fornecendo a identificação e melhorando a avaliação clínica, permitindo uma abordagem de resposta mais precisa e rápida.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Obtenção dos isolados de *Salmonella* Minnesota e *Salmonella* Enteritidis

As cepas de *Salmonella* ssp foram obtidas do Laboratório de Pesquisa em Ciências da Saúde (LPCS), localizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) campus II, proveniente do grupo de pesquisa do Professor Dr. Fábio Juliano Negrão. Foram utilizadas as espécies *Salmonella* Minnesota e *Salmonella* Enteritidis. Estas isoladas de fezes humanas e avícolas de sete estados brasileiros - Distrito Federal (DF), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Paraná (PR) e Santa Catarina (SC). Todas as cepas foram identificadas por sorotipagem pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). As cepas foram classificadas pela técnica de Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) com base no protocolo PulseNet de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (SILVA, 2012).

6.2 Preparo da amostra

Os preparos das amostras foram feitos no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS), localizado na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) campus II. As cepas foram descongeladas em estufa de desenvolvimento microbiológico. Transferiu-se uma alçada de cada cepa para tubos de ensaio contendo 5 ml de caldo BHI em dupla concentração. Os tubos foram inoculados em estufa durante 24h a 37°C. Após, com auxílio de alça de platina, foram feitas estrias de esgotamento de cada cepa em placas de petri contendo meio de cultura/ágar específico para o desenvolvimento da bactéria. As placas foram inoculadas a 37°C durante 24h. Os meios utilizados foram: Ágar *Salmonella-Shigella*, Entérico de Hektoen, Macconkey, e Três Açúcares e Ferro (TSI). Decorrido o tempo de inoculação, transferiu-se as colônias desenvolvidas para tubos de ensaio contendo 10ml de solução salina 0,9%, previamente esterilizada (SOHN et al, 2009). Os tubos contendo solução salina e colônias de *Salmonella* foram agitados em aparelho vortex para homogeneização da amostra. Imediatamente, foram encaminhados para análise espectroscópica em fluorímetro.

6.3 Análise Espectroscópica de Fluorescência

Testes de espectroscopia de absorção no UV-Vis foram realizados para identificar o comprimento de onda de excitação a ser utilizado na técnica de espectroscopia de fluorescência. Após análises de espectroscopia de absorção de UV-Vis, foi identificado o comprimento de onda de excitação de 280 nm.

O espectrofotômetro utilizado foi Cary Eclipse (Varian) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET/UFGD) que possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de xenônio (80 Hz) e potência de pico equivalente à 75kW; possui dois monocromadores, um monocromador para seleção de comprimento de onda de excitação e outro para seleção de comprimento de onda emitido pela amostra. Um tubo fotomultiplicador (R928) é utilizado para a detecção da radiação emitida. Para calibração do aparelho utilizou-se o padrão de rodamina.

A análise abrangeu região espectral de comprimento de onda (λ) 200 à 700nm, com excitação no comprimento de onda de 280nm. Os filtros de excitação e emissão foram ajustados ambos em aberto e a fenda para passagem de radiação eletromagnética de excitação e emissão foi utilizada em 5nm. Para leitura, utilizou-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico de faces polidas. Colocou-se 3ml de solução salina 0,9% na cubeta para obtenção de dados do padrão do solvente. Após, fez-se leitura de 3ml da amostra (colônias de salmonela diluídas em solução salina 0,9%) (SOHN et al, 2009). Para obtenção e tratamento dos dados, utilizou-se software OriginPro 8. Todas as análises foram feitas em triplicata.

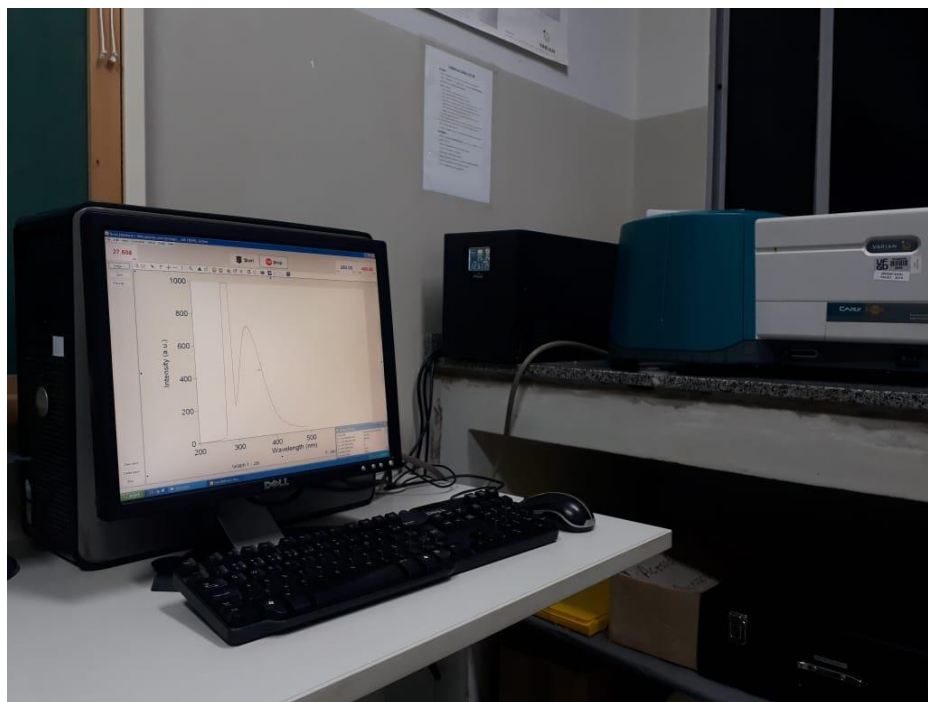


Figura 1 Espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET/UFGD).

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados da Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) demonstraram que alguns padrões correspondiam exatamente aos mesmos sorotipos. No entanto, os sorotipos de *Salmonella* Enteritidis e Minnesota apresentaram mais de um padrão clonal, sugerindo variedade genética, mesmo dentro da mesma região (SILVA, 2012). Isso pode ocorrer pois um ou mais nucleotídeos podem alterar os sinais de transcrição ou a leitura dos genes usados para discriminação de sorotipos. Desta forma, as cepas repicadas podem até perder o fenótipo, mas preservar o mesmo genótipo de sua cepa original (SALIPANTE, 2015; THONG, 2002).

Embora demonstrem indicativos de evolução paralela, é possível que estas diferenças sejam devido a mutações pontuais ou pequenas alterações genéticas, mas que são incapazes de alterar os padrões de PFGE (SALIPANTE, 2015; THONG, 2002).

7.1 Análise Espectroscópica de Fluorescência

O pico na região de 300 a 400 nm é correspondente a modulação das colônias inseridas no meio. Durante as análises, as amostras apresentaram valores de pico de emissão máxima entre $\lambda_{em/max} = 332$ à 338 nm.

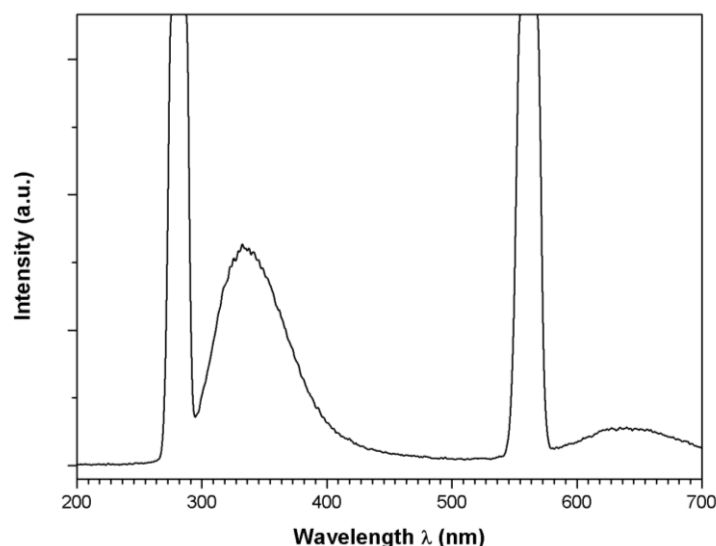


Figura 2 Espectro de emissão completo de um isolado de *Salmonella* Minnesota. $\lambda_{ex} = 280$ nm e $\lambda_{em/max} = 332$ nm

Os comprimentos de onda de emissão máxima encontrados durante as análises para os isolados de ambos sorotipos são muito próximos, porém isso não era inesperado devido as amostras pertencerem à mesma espécie, no caso, a *Salmonella enterica*. Estudos demonstraram que cepas de salmonela apresentam comprimento de onda de emissão máximo entre 300 a 450 nm, quando excitados em $\lambda = 280$ nm (SOHN, 2009). Porém estes estudos não compararam os sorotipos. Esta diferenciação se faz muito importante pelo aumento da resistência dos micro-organismos em relação aos antibióticos. Variados sorotipos de salmonela apresentam comportamentos diferentes em relação a antibióticos como é o caso de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Minnesota que mesmo possuindo características genicas muito próximas se comportam de forma diferente expostas aos mesmos antibióticos (SILVA, 2012; BRASIL, 2019).

Neste estudo, pode se perceber que os sorotipos Enteritidis e Minnesota também se comportam diferentes com relação as análises de espectroscopia de fluorescência, mesmo em diferentes meios de cultura (Fig. 3).

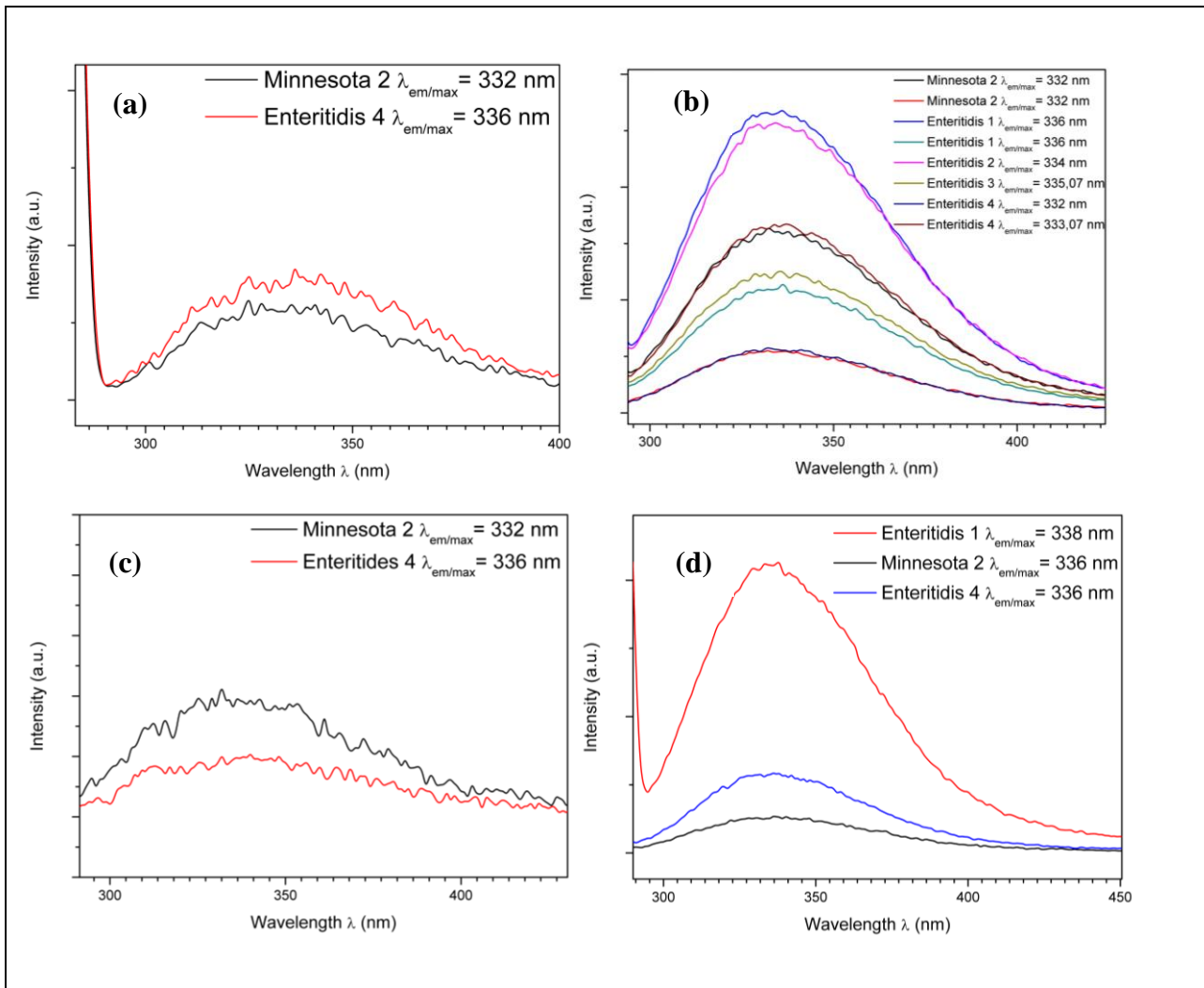


Figura 3 Espectros de diferentes cepas de *Salmonella* Minnesota e Enteritidis em (a) Ágar Entérico de Hektoen, (b) Ágar Macconkey, (c) Ágar *Salmonella-Shigella* e (d) Ágar TSI.

De acordo com os resultados das análises, o Ágar TSI não apresentou bom desempenho para classificar o sorotipo. Os comprimentos de onda de emissão máxima ficaram entre 336 e 338 nm (Fig. 3d), com variação entre o mesmo sorotipo Enteritidis $\lambda_{em/max} = 336$ e 338 nm, e foi o único a apresentar $\lambda_{em/max}$ diferente para *S. Minnessota* ($\lambda_{em/max} = 332$ nm).

O Ágar Macconkey (Fig. 3b) demosntrou bom desempenho para *S. Minessota*, sempre apresentando $\lambda_{em/max} = 332$ nm; porém para o sorotipo Enteritidis houve grande variação até mesmo para o mesmo isolado, como o caso da Enteritidis 4 (Fig. 3b) que foram obtidos valores de $\lambda_{em/max} = 332$ nm e 333,07 nm. Desta forma o Ágar Macconkey não possui comportamento ideal para classificação, podendo até apresentar mesmo comprimento de onda de emissão para sorotipos diferentes e para mesma cepa.

Os meios de cultura Ágar Entérico de Hektoen (Fig. 4a) e Ágar *Salmonella-Shigella* (Fig. 4b) apresentaram bons resultados, sendo o $\lambda_{em/max}$ sempre com valores constantes para Minnesota $\lambda_{em/max} = 332$ nm e Enteritidis $\lambda_{em/max} = 336$ nm (Fig 3a e 3c). Porém apesar de ser um meio específico, no ágar *Salmonella-Shigella* observou-se dificuldade de crescimento em alguns isolados, servindo como fator negativo para escolha de um meio de cultura para a técnica.

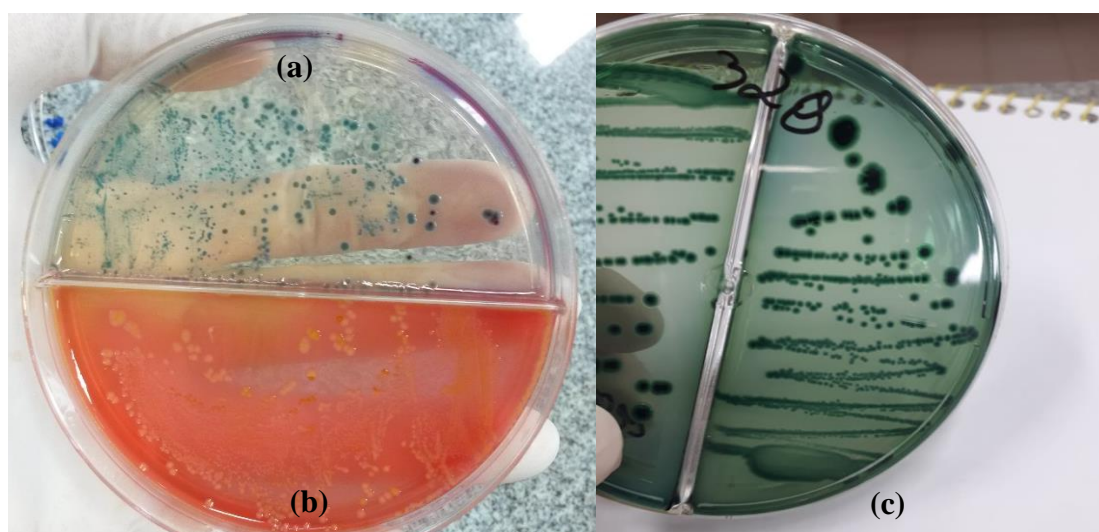


Figura 4 Desenvolvimento de *Salmonella* spp. em (a) Ágar Entérico de Hektoen, (b) Ágar *Salmonella-Shigella* apresentando bom crescimento e visualização de colônias e (c) desenvolvimento de *Salmonella* Minnesota em Ágar Entérico de Hektoen.

Desta forma, o Ágar Entérico de Hektoen destacou-se por apresentar constância nos valores de comprimento de onda de emissão e por obter bom crescimento de colônias em todas as cepas analisadas (Fig. 4c). Este ágar já é indicado por diferentes órgãos reguladores em procedimentos para isolamento de salmonela (BRASIL, 2011), ficando evidente que o Ágar Entérico de Hektoen pode apresentar grande eficiência para análises de salmonela em espectroscopia de fluorescência.

Também foram obtidos os gráficos comparativos para cada sorotipo (*S. Enteritidis* e *S. Minnesota*) e para cepas diferentes. Observou-se que as cepas de *Salmonella* Enteritidis ficaram com picos de $\lambda_{em/max} = 336$ nm na maioria das análises (Fig. 5a), principalmente com Ágar Entérico de Hektoen, que demonstrou melhor desempenho. Porém, o Ágar Macconkey apresentou picos de valores diferentes para o sorotipo e para mesma cepa, Enteritidis 331 (Fig. 5e).

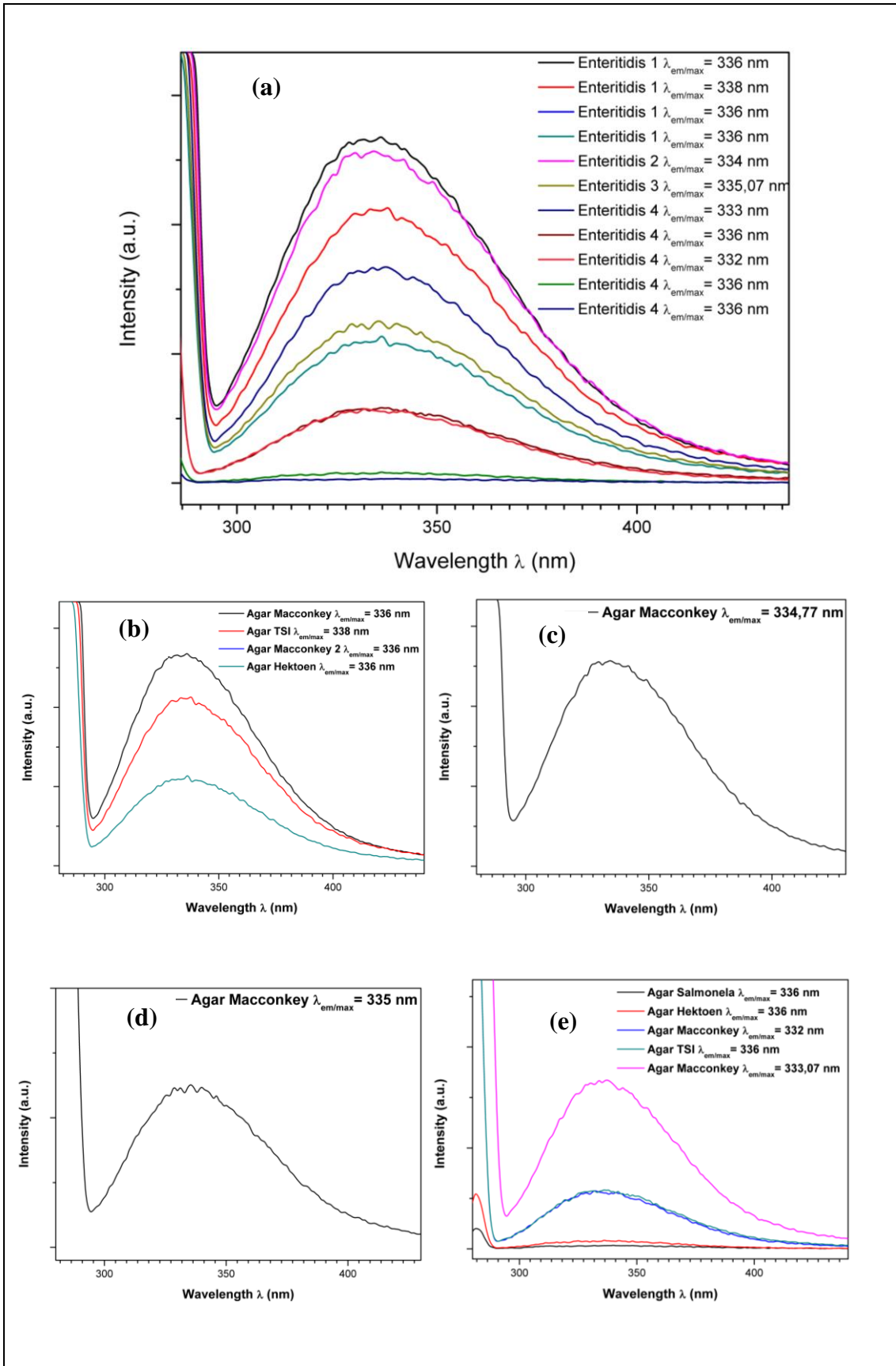


Figura 5 (a) Espectro de emissão de fluorescência de *Salmonella* Enteritidis; (b) *Salmonella* Enteritidis 1, (c) *Salmonella* Enteritidis 2, (d) *Salmonella* Enteritidis 3, (e) *Salmonella* Enteritidis 4.

Para as cepas de *Salmonella* Minnesota, apenas uma amostra apresentou valor de comprimento de onda de emissão diferente de 332 nm. Esta refere-se a cepa 2 com desenvolvimento em meio de cultura Ágar Macconkey. Diferente dos isolados de *Salmonella* Enteritidis, foi feito o crescimento de uma cepa (Fig 6b) de *Salmonella* Minnesota em Ágar PCA (Plate Count Agar) para analisar se haveria mesmo comportamento. Apesar de apresentar mesmo comprimento de onda de emissão das demais amostras, o Ágar PCA não foi utilizado para padrão por não ser um meio seletivo, podendo facilmente ocorrer contaminações de outros micro-organismos.

Ambas as cepas 1 e 2 de *S. Minnesota* apresentaram $\lambda_{em/max} = 332$ nm em seus espectros de emissão de fluorescência com todos os meios de cultura.

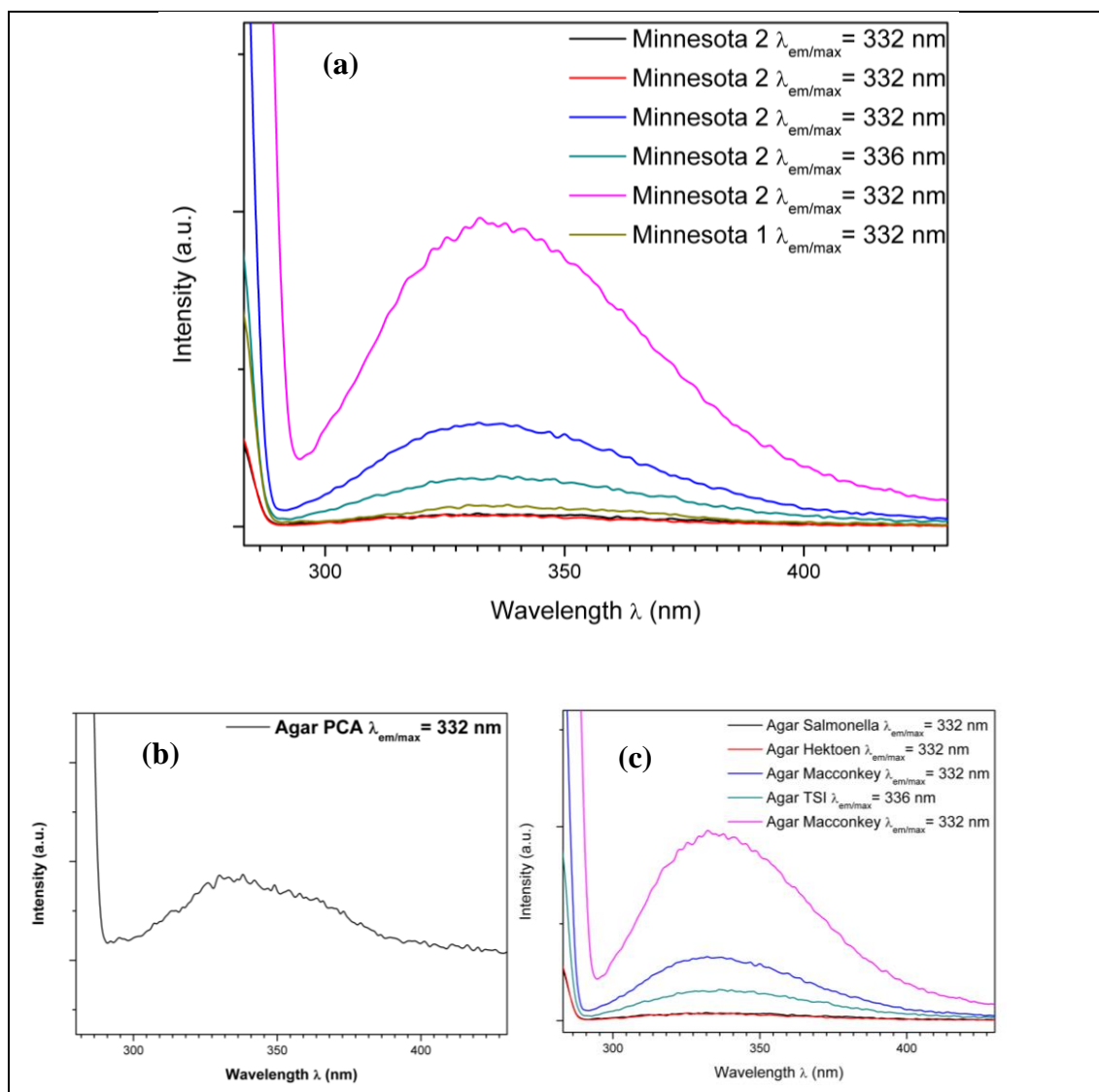


Figura 6 (a) Espectro de emissão de fluorescência de *Salmonella* Minnesota; (b) *Salmonella* Minnesota isolado 1, (c) *Salmonella* Minnesota isolado 2.

SHAKIBAIE *et al.* e GUO *et al.* encontraram resultados com demais comprimentos de onda de emissão de diversas bactérias, porém com diferentes comprimentos de onda de excitação. Isso ocorre porque não há conclusão de qual componente na célula bacteriana é responsável pela emissão. Sendo assim as análises contribuem para auxiliar no desenvolvimento de um dispositivo com sensibilidade relevante para oferecer uma alternativa em termos de custo e tempo frente as análises de classificação e sorotipagem (SHAKIBAIE *et al.*, 2018; GUO *et al.*, 2017).

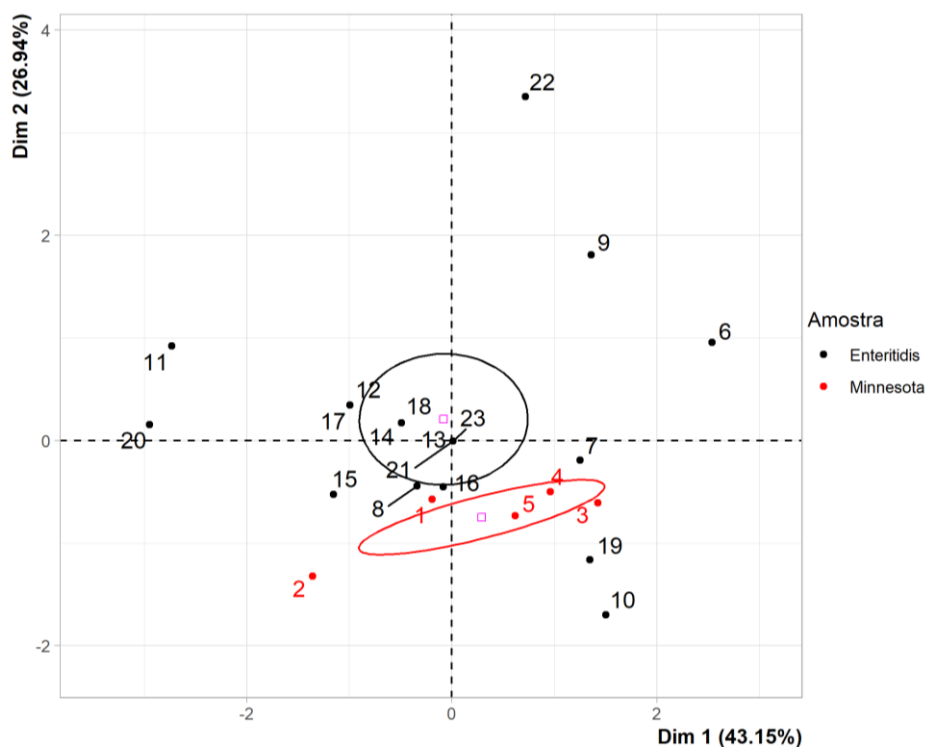


Figura 7 Análise multivariada obtida por PCA através dos espectros de emissão de fluorescência de *Salmonella* Minnesota e *Salmonella* Enteritidis.

Visando comparar os espectros de cada sorotipo, foi feito tratamento dos resultados obtidos pelo método estatístico multivariado PCA (Análise de Componentes Principais). Assim como o que foi observado através dos gráficos de emissão, há diferença entre os sorotipos *S. Minnesota* e *S. Enteritidis* (Fig 7). Esta é uma indicação de que os dados são adequados para classificação, e pode indicar que a análise de identificação por espectroscopia de fluorescência é uma possível análise alternativa de identificação discriminante entre os sorotipos.

8 CONCLUSÃO

Durante as análises pode-se encontrar uma faixa espectral de comprimento de onda de emissão para a espécie salmonela de 332 nm a 338 nm, a mesma encontrada em demais estudos da literatura.

A análise de espectroscopia de fluorescência conseguiu diferenciar os sorotipos *S. Minnesota* e *S. Enteritidis* através dos espectros de emissões dos isolados, apresentando comprimento de onda diferente para cada subespécie e comprimento de onda constante para o mesmo sorotipo quando inoculado em ágar Entérico de Hektoen.

Pode-se perceber que é possível adaptar a técnica de espectroscopia de fluorescência para separar não apenas espécies mas sorotipos.

De acordo com os resultados apresentados, uma melhor investigação para a utilização da técnica é viável, não para substituir as atuais metodologias, mas para auxiliar na agilidade de se obter um melhor diagnóstico frente a contaminações ou surtos.

9 REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 1-64, dez./2011. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Acesso em: 1 maio. 2019.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde Departamento De Vigilância Das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral De Doenças Transmissíveis. 2019. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2020.

CARSTEAN, E. M. et al. In situ fluorescence measurements of dissolved organic matter: A review. **Science of the Total Environment**, Sydney, v. 699, n. 1, p. 1-16, jan./2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719343529?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

DOUGNON, Tamègnon Victorien; LEGBA, Boris; DEGUENON, Esther. Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of Salmonella species: A Review. **Notulae Scientia Biologicae**, Cotonou, Benin, v. 9, n. 4, p. 466-472, nov./2017.

EL-TABONI, F. et al. Fluorescence Spectroscopy Analysis of the Bacteria?Mineral Interface: Adsorption of Lipopolysaccharides to Silica and Alumina. **Langmuir**, Toronto, v. 36, n. 7, p. 1623-1632, jan./2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02158>. Acesso em: 30 ago. 2020.

GANGATHRAPRABHU, B. et al. A review on the origin of multidrug-resistant *Salmonella* and perspective of tailored phoP gene towards avirulence. **Microbial Pathogenesis**, India, v. 147, n. 1, p. 1-12, jun./2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088240102030718X?via%3Dihub>. Acesso em: 31 jul. 2020.

GUO, R. et al. A rapid and low-cost estimation of bacteria counts in solution using fluorescence spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 409, n. 1, p. 3959-3967, abr./2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0347-1>. Acesso em: 11 ago. 2020.

SALIPANTE, S. J. et al. Application of Whole-Genome Sequencing for Bacterial Strain Typing in Molecular Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 53, n. 4, p. 1072-1079, jan./2015. Disponível em: <https://jcm.asm.org/content/jcm/53/4/1072.full.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2020.

SHAKIBAIE, Fardad; LAMARD, Laurent; RUBINSZTEIN-DUNLOP, Halina; WALSH, Laurence J. (February 23rd 2018). Application of Fluorescence Spectroscopy for Microbial Detection to Enhance Clinical Investigations, **Photon Counting - Fundamentals and Applications**, Nikolay Britun and Anton Nikiforov, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.73616. Available from: <https://www.intechopen.com/books/photon-counting-fundamentals-and-applications/application-of-fluorescence-spectroscopy-for-microbial-detection-to-enhance-clinical-investigations>

SILVA, Quézia Moura Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros / Quézia Moura Silva. Dourados, MS: **UFGD**, 2012. 97f. il.

SOHN, M. et al. Fluorescence Spectroscopy for Rapid Detection and Classification of Bacterial Pathogens. **Applied Spectroscopy**, Georgia, v. 63, n. 11, p. 1251-1255, nov./2009. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1366/000370209789806993>>. Acesso em: 29 out. 2019.

THONG, K. L. et al. Genetic Diversity of Clinical and Environmental Strains of *Salmonella enterica* Serotype Weltevreden Isolated in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, University of Malaya, v. 40, n. 7, p. 2498-2503, jun./2002. Disponível em: <<https://jcm.asm.org/content/40/7/2498>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Acesso em: 19 maio 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella (non-typhoidal)**. 2018. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Acesso em: 10 mar. 2020.

CAPÍTULO III

Normas para publicação do artigo

O artigo foi redigido conforme as normas da revista “Food Chemistry”, disponíveis em: <https://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors>.

Identification of *Salmonella* spp. by Fluorescence Spectroscopy

Brenda Gonsalves Sturnich^a, Kelly Cristina da Silva Brabes^b

^aFaculdade de Ciências e Tecnologia Ambiental, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

^bFaculdade de Engenharia, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brasil.

ABSTRACT

Salmonella are the main etiological agents of foodborne diseases in the world, responsible for millions of diarrheal diseases and thousands of deaths per year. Despite being a widely known species, the process for confirming it as the cause of foodborne diseases is slow and of high economic cost. To confirm the diagnosis, the microorganism is isolated in a culture medium and biochemical characterization test, but these procedures take 15 days according to the rules established by Anvisa (National Health Surveillance Agency). Understanding the importance of reducing the response time of conventional methods, samples of *Salmonella* isolates were evaluated in a spectrofluorimeter. The strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Minnesota were inoculated on several agars (*Salmonella*-*Shigella* Agar, Hektoen Enteric, Macconkey, and Three Sugars and Iron); after the inoculation period, their colonies were diluted in 0.9% saline solution and, to obtain their emission spectra, they were analyzed in the spectrofluorimeter with wavelength excitation at 280 nm, ranging from 200 to 700 nm. With the acquisition of spectra, it was concluded that Hektoen's Enteric Agar has better performance for the analysis. Still, it was found that there is a difference in the emission wavelength of serotypes, in which *Salmonella* Enteritidis presented $\lambda_{em} = 336$ nm and the strains of *Salmonella* Minnesota presented $\lambda_{em} = 332$ nm.

1 Introduction

Among the foodborne diseases caused by the bacteria *Salmonella* spp. it is of great importance because it is the second with the highest incidence of contamination. Human contamination occurs mainly orally through ingestion of contaminated water or food, causing different diseases such as typhoid fever, septicemia, infections located in various body tissues and enteritis (WHO, 2018; GANGATHRAPRABHU et al, 2020). Other factors such as improper storage, temperature, cooking and poor personal hygiene can cause contamination (WHO, 2020; DOUGNON et al, 2017).

The global concern for foodborne illnesses, particularly caused by eating food contaminated by bacteria, requires rapid monitoring and detection techniques. The current methodology of bacterial culture is time-consuming; for isolation and identification of the species the evaluation currently adopted requires a period of approximately 15 days (EL-TABONI et al, 2020; BRASIL, 2011).

Therefore, there is a need to develop more direct, fast and sensitive techniques for detecting bacterial pathogens, mainly from foods that cause millions of contaminations per year and around 420 thousand deaths worldwide by eating contaminated food.

(GANGATHRAPRABHU et al, 2020; WHO, 2020).

In search of a fast, convenient and economical method for microbiological monitoring, including monitoring of food safety, public and environmental health, studies with fluorescence spectroscopy are being increasingly performed (CARSTEA et al, 2020; EL-TABONI et al, 2020).

Fluorescence spectroscopy has a significant value for the laboratory evaluation of complex materials and mixtures, arousing interest in its use as an alternative method to identify and differentiate bacteria in clinical and food applications (SHAKIBAIE et al, 2018).

Considering the importance of rapid treatment for foodborne diseases and food-borne outbreaks, this research aims to determine the spectral emission range of the *Salmonella* spp. and differentiate the emission wavelength for *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Minnesota. With the advancement of technique in the area, the methodology would assist health professionals by providing identification and improving clinical evaluation, allowing a more accurate and quick response approach.

2 Materials and methods

2.1 Obtaining the Salmonella Minnesota and Salmonella Enteritidis isolates

The strains of *Salmonella* ssp were obtained from the Health Sciences Research Laboratory (LPCS), located at Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). All strains were identified by serotyping by the Enterobacteria Laboratory of the Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil). Strains were classified using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique based on the protocol PulseNet de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (SILVA, 2012).

2.2 Sample preparation

One handle of each strain was transferred to test tubes containing 5 ml of broth BHI in double concentration. The tubes were inoculated for 24 hours at 37°C. Afterwards, with the aid of a platinum loop, streak streaks were done of each strain in petri dishes containing specific culture medium / agar for the development of the bacteria. The plates were inoculated at 37°C for 24h. The media used were: *Salmonella-Shigella* Agar, Hektoen's Enteric, Macconkey, and Three Sugars and Iron (TSI). After the inoculation time, the developed colonies were transferred to test tubes containing 10 ml of 0.9% saline solution (SOHN et al, 2009). The tubes containing saline solution and *Salmonella* colonies were shaken in a vortex apparatus to homogenize the sample. Immediately, they were referred for spectroscopic analysis on a fluorimeter.

2.3 Spectroscopic Fluorescence Analysis

UV-Vis absorption spectroscopy tests were performed to identify the excitation

wavelength to be used in the fluorescence spectroscopy technique. After UV-Vis absorption spectroscopy analyzes, the excitation wavelength of 280 nm was identified.

The spectrophotometer used was Cary Eclipse (Varian) which has a pulsed xenon lamp as excitation source (80 Hz) and peak power equivalent to 75kW; it has two monochromators, one monochromator to select the excitation wavelength and the other to select the wavelength emitted by the sample. A photomultiplier tube (R928) is used to detect the emitted radiation. To calibrate the device, the rhodamine standard was used.

The analysis covered a wavelength spectral region of (λ) 200 to 700nm, with excitation at a wavelength of 280nm. The excitation and emission filters were set both open and the slot for the passage of excitation and emission electromagnetic radiation was used at 5nm.

For reading, a quartz cuvette with a 1 cm optical path of polished phases was used. Three milliliters of 0.9% saline solution was placed in the cuvette to obtain data on the solvent standard. Afterwards, 3 ml of the sample was read (*salmonella* colonies diluted in 0.9% saline) (SOHN et al, 2009). To obtain and process the data, OriginPro 8 software was used. All analyzes were performed in triplicate.

3 Results and discussion

3.1 Fluorescence Spectroscopic Analysis

The central peak corresponds to the modulation of the colonies inserted in the medium. During the analysis, they presented values between $\lambda_{em} = 332$ at 338 nm.

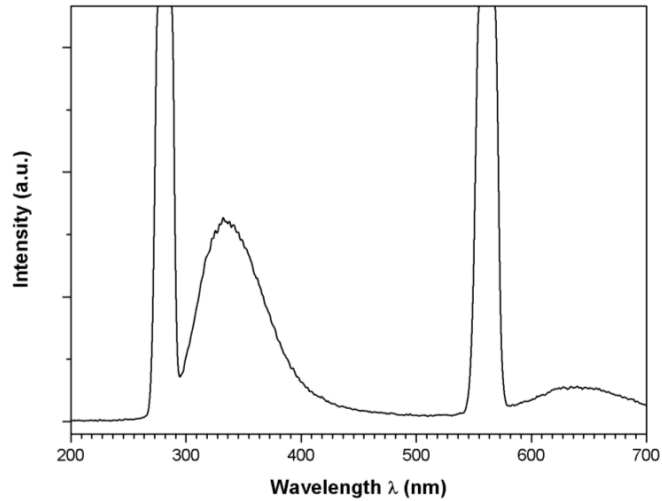


Figure 1 Emission spectrum of Salmonella Minnesota. $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ and $\lambda_{em} = 332 \text{ nm}$

The emission wavelengths found are very close, but this was not unexpected because the samples belong to the same species, in this case, Salmonella. Studies have shown that strains of salmonella have an emission wavelength between 300 to 450 nm, when excited at $\lambda = 280 \text{ nm}$ (SOHN, 2009). However, these studies did not compare serotypes.

In this study, it can be seen that the Enteritidis and Minnesota serotypes also behave differently with respect to fluorescence spectroscopy analyzes, even in different culture media (Fig. 2).

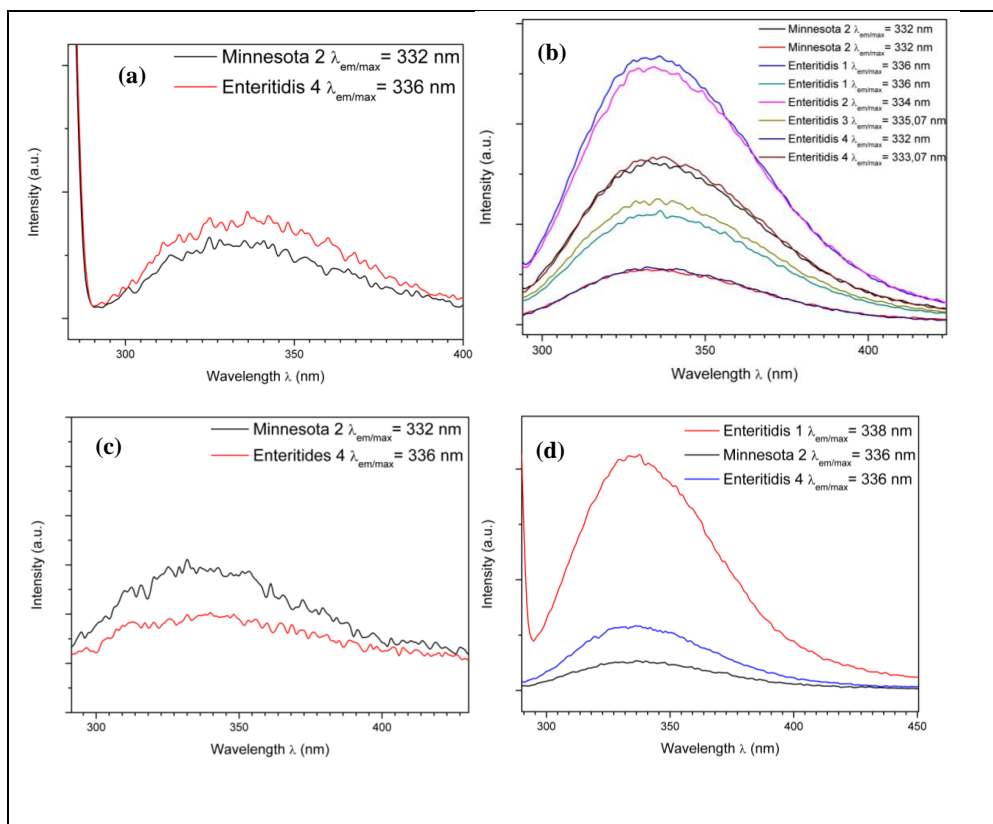


Figure 2 Spectra of different strains of Salmonella Minnesota and Enteritidis on (a) Hektoen Enteric Agar, (b) Macconkey Agar, (c) Salmonella-Shigella Agar and (d) TSI Agar.

According to the results of the analyzes, the TSI Agar did not perform well to classify the serotype. The emission wavelengths were between 336 and 338 nm (Fig. 2d), with variation between the same serotype Enteritidis $\lambda_{em} = 336$ and 338 nm, and was the only one to present a different λ_{em} for S. Minnessota ($\lambda_{em} = 332$ nm).

Macconkey Agar (Fig. 2b) showed good performance for S. Minnessota, always showing $\lambda_{em} = 332$ nm; however, for the Enteritidis serotype there was a great variation even for the same strain, as in the case of Enteritidis 331 (Fig. 2b), where values of $\lambda_{em} = 332$ nm and 333.07 nm were obtained. Thus, Macconkey Agar does not have ideal behavior for classification, and may even present the same emission wavelength for different serotypes and for the same strain.

The Hektoen Agar Enteric and Salmonella-Shigella Agar culture media showed good results, with λ_{em} always with constant values for Minnessota $\lambda_{em} = 332$ nm and Enteritidis $\lambda_{em} = 336$ nm (Fig 2a and 2c). However, despite being a specific medium, in the

Salmonella-Shigella agar there was difficulty in growth in some strains, serving as a negative factor for choosing a culture medium for routine practices. In this way, Hektoen's Enteric Agar stood out for presenting constant emission wavelength values and for obtaining good colony growth in all analyzed strains. This agar is already indicated by different regulatory bodies in procedures for the isolation of salmonella (BRASIL, 2011), making it clear that Hektoen's Enteric Agar can be highly efficient for salmonella analysis in fluorescence spectroscopy.

Comparative graphs were also obtained for each serotype (S. Enteritidis and S. Minnessota) and for different strains. It was observed that the strains of Salmonella Enteritidis had peaks of $\lambda_{em} = 336$ nm in most analyzes (Fig. 3a), especially with Hektoen's Enteric Agar, which showed better performance. However, Macconkey Agar showed peaks of different values for the serotype and for the same strain, Enteritidis 331 (Fig. 3e).

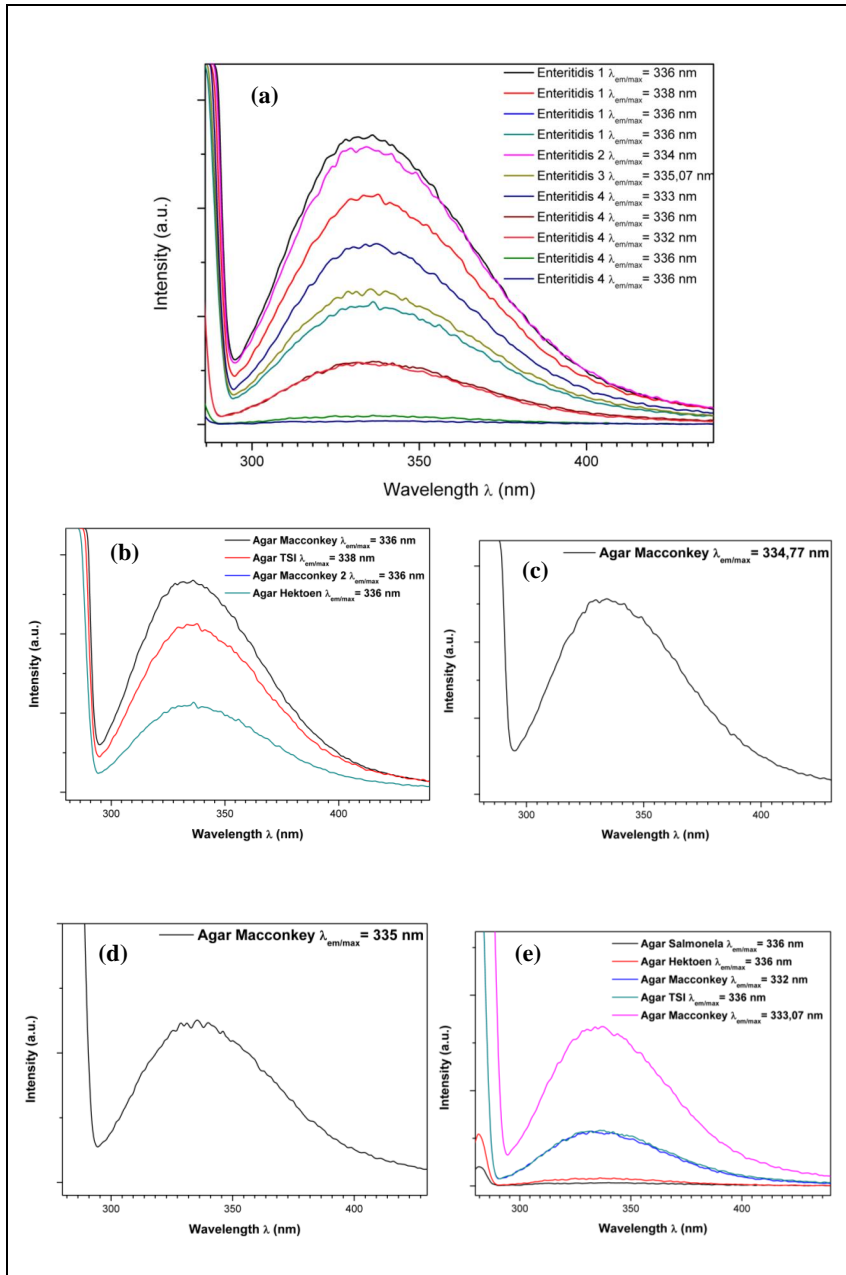


Figure 3 (a) *Salmonella* Enteritidis fluorescence emission spectrum; (b) *Salmonella* Enteritidis isolate 118, (c) *Salmonella* Enteritidis isolate 183, (d) *Salmonella* Enteritidis isolate 184, (e) *Salmonella* Enteritidis isolate 331.

For the strains of *Salmonella* Minnesota, only one sample had an emission wavelength value other than 332 nm. This refers to strain 328 with development in Agar Macconkey culture medium.

Unlike *Salmonella* Enteritidis isolates, a *Salmonella* Minnesota strain (Fig 4b) was grown on PCA Agar (Plate Count Agar) to analyze whether there would be the same behavior.

Despite having the same emission wavelength as the other samples, PCA Agar was not used as a standard because it is not a selective medium, and contamination of other microorganisms can easily occur.

Both strains 107 and 328 from *S. Minnesota* presented $\lambda_{em} = 332$ nm in their fluorescence emission spectra with all culture media.

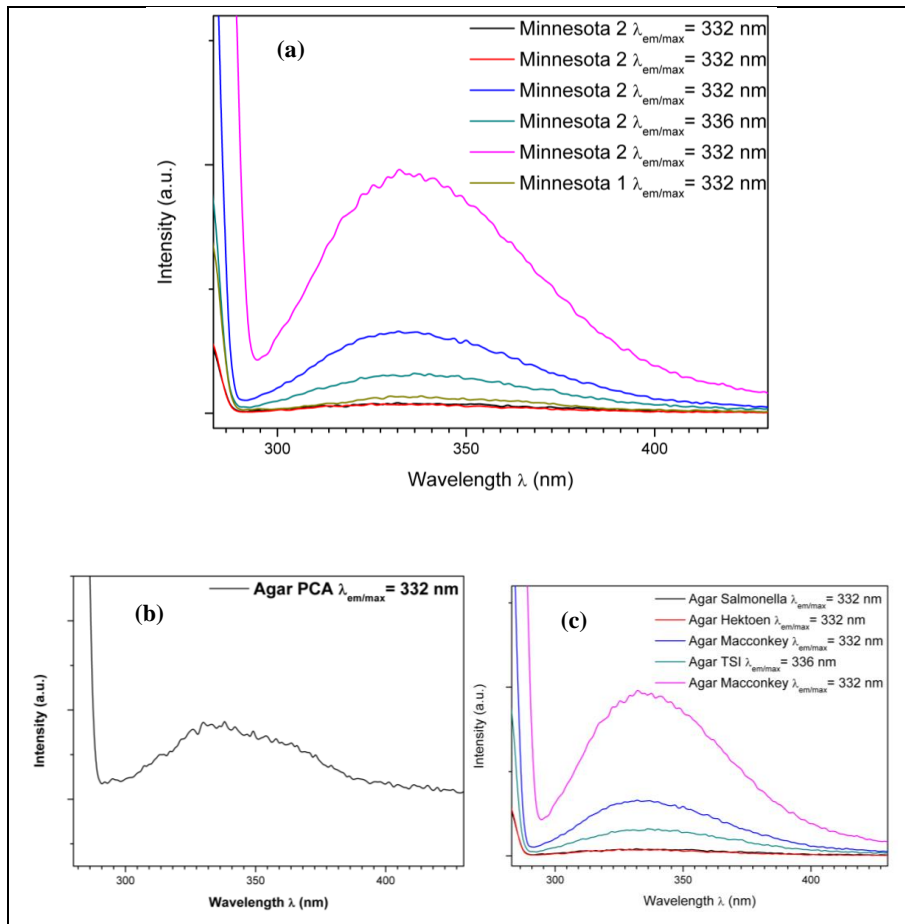


Figure 4 (a) Salmonella Minnesota fluorescence emission spectrum; (b) Salmonella Minnesota isolate 107, (c) Salmonella Minnesota isolate 328.

In the literature it is possible to find results with other wavelengths of emission of different bacteria, but with different wavelengths of excitation. This is because there is no conclusion as to which component in the bacterial cell is responsible for the emission (SHAKIBAIE et al, 2018; GUO et al, 2017).

Thus, the analyzes contribute to assist in the development of a device with relevant sensitivity to offer an alternative in terms of cost and time compared to the classification and serotyping analyzes.

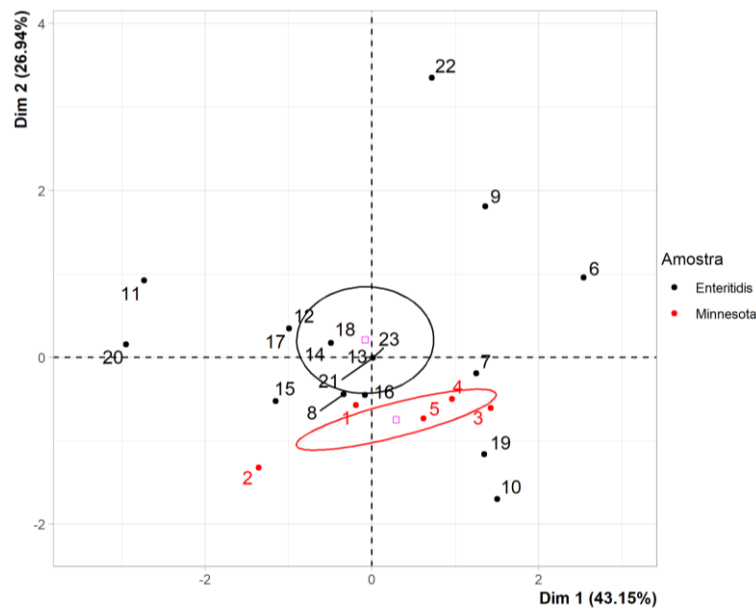


Figure 5 Multivariate analysis obtained by PCA through the fluorescence emission spectra of Salmonella Minnesota and Salmonella Enteritidis.

In order to compare the spectra of each serotype, the results obtained by the multivariate statistical method PCA (Principal Component Analysis) were treated. As with the emission graphs, there is a difference between the *S. Minnesota* and *S. Enteritidis* serotypes (Fig 5). This is an indication that the data are suitable for classification, and may indicate that the analysis of identification by fluorescence spectroscopy is a possible alternative analysis of discriminant identification between serotypes.

4 Conclusion

During the analysis, a spectral range of emission wavelength for the salmonella serotypes can be found from 332 nm to 338 nm, the same found in other studies in the literature.

The fluorescence spectroscopy analysis was able to differentiate the *S. Minnesota* and *S. Enteritidis* serotypes through the emission spectra of the isolates, presenting different wavelengths for each serotype and constant wavelengths for the same serotype when inoculated on Hektoen Enteric Agar.

It can be seen that it is possible to adapt the fluorescence spectroscopy technique to separate not only species but serotypes.

According to the results presented, a better investigation for the use of the technique is feasible, not to replace the current methodologies, but to assist in the agility of obtaining a better diagnosis in the face of contamination or outbreaks.

5 References

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz**, Brasília, v. 1, n. 1, p. 1-64, dez./2011. Available in: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>. Access in: 1 maio. 2019.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde Departamento De Vigilância Das Doenças Transmissíveis Coordenação Geral De Doenças Transmissíveis. 2019. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Available in: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/mayo/17/Apresentacao-Surtos-DTA-Maio-2019.pdf>. Access in: 13 jun. 2020.

CARSTEA, E. M. *et al.* In situ fluorescence measurements of dissolved organic matter: A review. **Science of the Total Environment**, Sydney, v. 699, n. 1, p. 1-16, jan./2020. Available in: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969719343529?via%3Dihub>>. Access in: 11 mar. 2020.

DOUGNON, Tamègnon Victorien; LEGBA, Boris; DEGUENON, Esther. Pathogenicity, Epidemiology and Virulence Factors of

Salmonella species: A Review. **Notulae Scientia Biologicae**, Cotonou, Benin, v. 9, n. 4, p. 466-472, nov./2017.

EL-TABONI, F. *et al.* Fluorescence Spectroscopy Analysis of the Bacteria?Mineral Interface: Adsorption of Lipopolysaccharides to Silica and Alumina. **Langmuir**, Toronto, v. 36, n. 7, p. 1623-1632, jan./2020. Available in: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b02158>. Access in: 30 ago. 2020.

GANGATHRAPRABHU, B. *et al.* A review on the origin of multidrug-resistant Salmonella and perspective of tailored phoP gene towards avirulence. **Microbial Pathogenesis**, India, v. 147, n. 1, p. 1-12, jun./2020. Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088240102030718X?via%3Dihub>. Access in: 31 jul. 2020.

GUO, R. *et al.* A rapid and low-cost estimation of bacteria counts in solution using fluorescence spectroscopy. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Germany, v. 409, n. 1, p. 3959-3967, abr./2017. Available in: <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0347-1>. Access in: 11 ago. 2020.

SALIPANTE, S. J. *et al.* Application of Whole-Genome Sequencing for Bacterial Strain Typing in Molecular Epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, USA, v. 53, n. 4, p. 1072-1079, jan./2015. Available in: <https://jcm.asm.org/content/jcm/53/4/1072.full.pdf>. Access in: 3 mar. 2020.

SHAKIBAIE, Fardad; LAMARD, Laurent; RUBINSZTEIN-DUNLOP, Halina; WALSH, Laurence J. (February 23rd 2018). Application of Fluorescence Spectroscopy for Microbial Detection to Enhance Clinical Investigations, **Photon Counting - Fundamentals and Applications**, Nikolay Britun and Anton Nikiforov, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.73616. Available in: <https://www.intechopen.com/books/photon-counting-fundamentals-and-applications/application-of-fluorescence-spectroscopy-for-microbial-detection-to-enhance-clinical-investigations>

SILVA, Quézia Moura Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros / Quézia Moura Silva. Dourados, MS: UFGD, 2012. 97f. il.

SOHN, M. *et al.* Fluorescence Spectroscopy for Rapid Detection and Classification of Bacterial Pathogens. **Applied Spectroscopy**, Georgia, v. 63,

n. 11, p. 1251-1255, nov./2009. Available in: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1366/000370209789806993>. Access in: 29 out. 2019.

THONG, K. L. *et al.* Genetic Diversity of Clinical and Environmental Strains of Salmonella enterica Serotype Weltevreden Isolated in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, University of Malaya, v. 40, n. 7, p. 2498-2503, jun./2002. Available in: <https://jcm.asm.org/content/40/7/2498>. Access in: 14 nov. 2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety**. 2020. Available in: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Access in: 19 maio 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella (non-typhoidal)**. 2018. Available in: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)). Access in: 10 mar. 2020.

ANEXOS

Anexo I – Valores Obtidos em Espectrofluorímetro

Tabela 1 Valores obtidos em espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian) da amostra 328 *Salmonella* Minnesota.

Amostra 328	<i>Salmonella</i> Minnesota
Wavelength (nm)	Intensity (a.u.)
200	-0,294334084
200,9499969	0,299625486
202,0599976	0,149655789
203,0099945	-0,149365202
203,9600067	-0,452147722
205,0700073	0,303536177
206,0299988	-0,458996326
206,9799957	1,248244643
207,9299927	-0,302434593
209,0399933	-0,312256038
210	0,299715251
210,9299927	-0,596302927
212,0299988	0,151791126
212,9600067	0,157654107

214,0599976	-0,150943399
215	0,153209731
215,9299927	-0,314119667
217,0299988	0,97260499
217,9600067	0,157952935
219,0599976	-0,793902814
220	-0,620539904
220,9299927	0
222,0299988	-0,317460299
222,9600067	0,464468181
224,0599976	0,475888312
225	0,940144181
225,9299927	0,967429817
227,0299988	-0,31323415
227,9600067	-0,791139245
229,0599976	-0,493664652
230	-0,163345307
230,9299927	1,665833712
232,0299988	0,469410092
232,9600067	-0,32959789
234,0599976	1,614465594
235	1,094605207
235,9299927	0
237,0299988	0,323467583
237,9600067	0,826582909

239,0599976	-0,48030737
240	0,832916856
241,0700073	0
242	0,487646282
243,0700073	0,648403287
244	-0,319693089
245,0700073	0,323939115
246	0,472217858
247,0700073	0,486696959
248	-0,332005322
249,0700073	-0,316305548
250	0,641745567
250,9299927	0,31756112
252,0299988	0
252,9600067	0,16680567
254,0599976	0
255	0,339789331
255,9299927	0,467289746
257,0299988	-0,157282159
257,9599915	-0,651784241
259,0599976	1,234758377
260	0
260,9299927	-0,321130395
262,0299988	0
262,9599915	-0,152928576

264,0599976	0,935016394
265	0,917992652
265,9299927	0
267,0299988	-0,155376002
267,9599915	-0,6142506
269,0599976	0,47147572
270	0,940144181
270,9299927	1,912045836
272,0299988	1,251564503
272,9599915	2,636067629
274,0599976	7,303807259
275	13,9442234
275,9299927	28,73828316
277,0299988	43,14024353
277,9599915	69,54058838
279,0599976	101,8753967
280	127,1622162
281,0700073	144,9364166
282	136,463562
283,0700073	129,9212646
284	106,4615402
285,0700073	72,36024475
286	48,3687706
287,0700073	22,67818451
288	11,3774271
289,0700073	6,221547604
290	3,774178267

290,9299927	3,320683002
292,0299988	3,409644365
292,9599915	4,81665659
294,0599976	5,718701363
295	6,942092896
295,9299927	4,356244087
297,0299988	6,497622967
297,9599915	6,065573692
299,0599976	7,118000507
300	7,853402615
301,0700073	8,533247948
302	8,37812233
303,0700073	9,867357254
304	9,294872284
305,0700073	8,646917343
306	11,67955208
307,0700073	11,40012836
308	12,39410114
309,0700073	14,21727753
310	15,03878498
310,9299927	14,18329239
312,0299988	15,54160118
312,9599915	15,49636745
314,0599976	12,53525543
315	15,4818325
315,9299927	16,34920502
317,0299988	14,1766634

317,9599915	12,42829895
319,0599976	14,55235672
320	18,34718513
321,0700073	16,73062134
322	17,68990517
323,0700073	18,13195229
324	18,16488075
325,0700073	19,99055672
326	19,15030479
327,0700073	18,57444763
328	16,73508072
329,0700073	20,92428207
330	17,20986938
331,0700073	20,29812813
332	21,78406715
333,0700073	18,61702156
334	19,97463608
335,0700073	17,42816734
336	19,91726685
337,0700073	19,14466476
338	19,1688385
339,0700073	18,37888718
340	19,72062492
341,0700073	18,22027016
342	19,34984589
343,0700073	19,62939644
344	17,68941879

345,0700073	17,68686676
346	17,57138443
347,0700073	18,7976017
348	17,46658516
349,0700073	18,32298279
350	17,3248024
351,0700073	19,17334557
352	17,91326141
353,0700073	18,81894875
354	18,64878082
355,0700073	17,27000999
356	17,00251961
357,0700073	16,02613831
358	15,79955387
359,0700073	13,2869339
360	13,25319767
361,0700073	17,62477303
362	13,36898422
363,0700073	13,5559597
364	12,78652763
365,0700073	14,06274223
366	13,74885464
367,0700073	12,56203461
368	11,03617477
369,0700073	10,81342793
370	11,70515633
371,0700073	11,0241251

372	13,47017288
373,0700073	12,22416306
374	11,05157375
375,0700073	10,3538866
376	10,41347599
377,0700073	11,35999966
378	9,135954857
379,0700073	11,83338547
380	10,63486958
381,0700073	9,92677021
382	9,66719532
383,0700073	7,900677681
384	9,92555809
385,0700073	8,05305481
386	8,100380898
387,0700073	8,182533264
388	8,447561264
389,0700073	7,462686539
390	4,536617279
391,0599976	7,081686497
391,9599915	6,748273373
393,0299988	4,994361401
393,9299927	5,341712475
395	5,268867016
396,0599976	5,910543442
396,9599915	6,350757122
398,0299988	5,519634247

398,9299927	5,172971249
400	4,010909557
401,0700073	4,300414562
402	2,700126886
403,0700073	5,915317535
404	4,024468899
405,0700073	3,727714777
406	3,805899143
407,0700073	4,923760891
408	4,372267723
409,0700073	3,992972374
410	4,799232483
411,0599976	4,229017735
411,9599915	4,360012054
413,0299988	3,60700798
413,9299927	4,933948517
415	4,165331841
416,0599976	3,310736179
416,9599915	2,590254068
418,0299988	4,039424896
418,9299927	4,492939472
420	3,491509199
421,0700073	2,833333254
422	3,466204405
423,0700073	3,027888536
424	2,500781536
425,0700073	2,18170476

426	1,607458591
427,0700073	3,596559763
428	3,023551702
429,0700073	2,9069767
430	1,610824704
431,0599976	2,280501604
431,9599915	1,565925479
433,0299988	1,846153855
433,9299927	1,10045588
435	2,091040611
436,0599976	2,866698503
436,9599915	2,308326483
438,0299988	1,913570404
438,9299927	3,00775671
440	2,042419434
441,0599976	1,992337227
441,9599915	1,514922023
443,0299988	1,975959182
443,9299927	1,64041996
445	2,180685282
446,0599976	2,85035634
446,9599915	1,580527902
448,0299988	2,161623001
448,9299927	1,535154939
450	1,878816366
451,0599976	2,283452511
451,9599915	3,054662466

453,0299988	1,232285857
453,9299927	0,771485925
455	2,218700409
456,0599976	0,15015015
456,9599915	2,262784719
458,0299988	1,44880867
458,9299927	1,152642846
460	1,691266894
461,0599976	0,931387782
461,9599915	2,005553722
463,0299988	1,62999177
463,9299927	1,66843617
465	0,764759839
466,0599976	1,558117747
466,9599915	2,488387585
468,0299988	0
468,9299927	1,412429333
470	0,933561504
471,0400085	1,57579577
471,9400024	1,081582189
472,980011	0,941324115
474,019989	1,74492383
475,0700073	0,341064125
475,9700012	1,25
477,0100098	1,393188834
478,0499878	0
478,9500122	1,122514486

480	1,109701872
481,0599976	2,200220108
481,9599915	0,481695563
483,0299988	1,28164053
483,9299927	1,68118608
485	1,655081034
486,0599976	1,12685132
486,9599915	0
488,0299988	0,917150676
488,9299927	0,316405654
490	0,461893767
491,0400085	0,30543679
491,9400024	0,150172696
492,980011	0,306278706
494,019989	1,98989737
495,0700073	0,306419462
495,9700012	0,930954218
497,0100098	1,243008018
498,0499878	1,140065193
498,9500122	0,311817884
500	1,208824396
501,0599976	0,768639505
501,9599915	1,372369647
503,0299988	1,41531682
503,9299927	1,381215572
505	1,994476914
506,0599976	1,398601413

506,9599915	1,21230495
508,0299988	1,070827603
508,9299927	0,15401201
510	0,311187178
511,0400085	0,616903126
511,9400024	0,762427568
512,9799805	1,37278831
514,0200195	0,476947546
515,0700073	1,065773368
515,9699707	-0,314564318
517,0100098	-0,153869823
518,0499878	2,287631512
518,9500122	0,321543396
520	0,156152412
521,039978	0,466417909
521,9400024	1,994476914
522,9799805	1,089663744
524,0200195	0,927500367
525,0700073	0,624512076
525,9699707	-0,456343174
527,0100098	1,242236018
528,0499878	0,942063093
528,9500122	1,57977891
530	0,463463634
531,0200195	0,941471815
532,0499878	0,783699036
532,9400024	0,619195044

533,9699707	0,771128893
535	0,634719133
536,0200195	1,12994349
537,0499878	2,308326483
537,9400024	-0,15248552
538,9699707	1,957905054
540	1,568381429
541,039978	0,159923241
541,9400024	1,072632551
542,9799805	0,624122322
544,0200195	0,670129001
545,0700073	2,018163443
545,9699707	0,323153973
547,0100098	1,250781655
548,0499878	2,332089424
548,9500122	2,394253969
550	4,302789211
551,039978	7,793860435
551,9400024	11,30573273
552,9799805	17,73766899
554,0200195	25,03887939
555,0700073	32,96882629
555,9699707	44,00559998
557,0100098	54,3764534
558,0499878	67,97557831
558,9500122	79,71015167
560	89,74763489

561,0200195	99,24504852
562,0499878	107,1260071
562,9400024	112,5587006
563,9699707	108,6262054
565	95,96577454
566,0200195	80,92485046
567,0499878	66,24750519
567,9400024	54,52864838
568,9699707	32,64232635
570	20,77197266
571,0200195	15,13298702
572,0499878	10,18946075
572,9400024	4,968382835
573,9699707	2,990242243
575	2,26688838
576,0200195	0,751201928
577,0499878	1,387176394
577,9400024	1,388032079
578,9699707	2,819548845
580	1,841055632
581,0200195	2,017067432
582,0499878	0,624122322
582,9400024	1,094776273
583,9699707	0,962618351
585	0,626860976
586,0200195	2,675901175
587,0499878	1,719556093

587,9400024	1,719556093
588,9699707	2,345215797
590	1,312335968
591,0200195	2,304855585
592,0499878	1,404713631
592,9400024	2,790697575
593,9699707	2,302379131
595	2,824858665
596,0200195	1,872659206
597,0499878	2,010827303
597,9400024	3,465658426
598,9699707	3,696857691
600	2,840909243
601,0100098	2,032520294
602,0200195	2,60456562
603,039978	3,148118973
604,0499878	3,096479654
605,0700073	1,759437084
605,9400024	2,31910944
606,9500122	1,57579577
607,9699707	2,624266863
608,9799805	2,192639112
610	2,851711035
611,0200195	2,025552988
612,0499878	3,170894384
612,9400024	2,528445005
613,9699707	2,492108345

615	2,057938814
616,0200195	3,762935162
617,0499878	4,975124359
617,9400024	3,78967309
618,9699707	3,571983099
620	3,118332386
621,0100098	3,874717474
622,0200195	2,451355696
623,039978	4,291845322
624,0499878	4,691797256
625,0700073	3,824701309
625,9400024	3,720930338
626,9500122	3,188581944
627,9699707	5,428040028
628,9799805	3,880179882
630	3,377291918
631,0100098	3,575685501
632,0200195	3,592066288
633,039978	4,053632736
634,0499878	3,486634493
635,0700073	3,978991032
635,9400024	2,422872066
636,9500122	3,135287762
637,9699707	2,882767439
638,9799805	2,783361673
640	4,433185101
641,0100098	1,559089541

642,0200195	2,472569942
643,039978	2,766026735
644,0499878	3,67412138
645,0700073	3,040486574
645,9400024	3,34768033
646,9500122	3,118844509
647,9699707	4,128294468
648,9799805	3,289988995
650	4,128950119
651	4,494033813
652	4,032883167
653	1,917239189
654	3,095495939
655	1,893939495
656	3,299293041
657	3,248335361
658	3,923491955
659	3,52166605
660	1,717140198
661,0100098	2,668759823
662,0200195	1,743541002
663,039978	3,769436121
664,0499878	3,305238962
665,0700073	3,653693438
665,9400024	2,536863804
666,9500122	2,607561827
667,9699707	2,215189934

668,9799805	3,483768702
670	2,073034763
671	3,712072372
672	1,53819859
673	1,744647145
674	3,384912968
675	2,505428314
676	1,300178766
677	2,355157852
678	2,221164465
679	2,183065653
680	2,167518139
681	1,292407155
682	2,737519979
683	1,428798199
684	0,656491041
685	1,798267126
686	2,497268677
687	2,744148493
688	2,098635674
689	2,672955751
690	1,465082169
691	2,343880653
692	1,265222192
693	1,106894374
694	3,008709431
695	1,764517188

696	2,098805189
697	1,950268149
698	2,415458918
699	1,128850102
700	1,761973381

Tabela 2 Valores obtidos em espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian) da amostra 331 *Salmonella* Enteritidis.

Amostra 331	<i>Salmonella</i> Enteritidis
Wavelength (nm)	Intensity (a.u.)
200	0
200,95	-0,149209
202,06	0,31027
203,01	0,4497077
203,96	-0,639488
205,07	1,4155395
206,03	-0,788644
206,98	-0,470958
207,93	0,1603078
209,04	1,0532652
210	-0,805023
210,93	0
212,03	0,6235386
212,96	0,6192909
214,06	0,7701787
215	-1,110406
215,93	-0,329598
217,03	1,2433945
217,96	0,3136271
219,06	-0,157903

220	0,3327787
220,93	-0,322997
222,03	-0,319387
222,96	-0,159363
224,06	-0,158028
225	0,3165058
225,93	0
227,03	-0,162364
227,96	0,3129891
229,06	0,3219057
230	0,6354249
230,93	0,8366801
232,03	-1,214882
232,96	0,4659832
234,06	-0,789017
235	0,1597699
235,93	0
237,03	0,3016591
237,96	0,6011422
239,06	0,1604364
240	0,3085943
241,07	-0,613591
242	0,1548947
243,07	-0,948917
244	1,07593
245,07	0,3142184
246	0,9460738

247,07	-0,152999
248	0
249,07	-0,303582
250	0,6091061
250,93	0,6048692
252,03	0,448833
252,96	0
254,06	0,3026176
255	0,1517681
255,93	0,9358914
257,03	0,1508296
257,96	0,1535862
259,06	0,4735596
260	1,0420285
260,93	-0,163586
262,03	-0,480461
262,96	1,4144272
264,06	-0,161212
265	0,1641228
265,93	0,3410641
267,03	0,622665
267,96	0
269,06	-0,159261
270	1,2478553
270,93	1,8744143
272,03	0,7954184
272,96	2,5090168

274,06	5,5718927
275	17,442766
275,93	30,921646
277,03	54,756805
277,96	76,803238
279,06	114,81091
280	140,10245
281,07	166,66667
282	161,09422
283,07	147,18416
284	120,99481
285,07	85,099602
286	52,664577
287,07	27,508837
288	13,452914
289,07	5,5693073
290	2,7372262
290,93	2,9655063
292,03	3,2263267
292,96	4,1493778
294,06	3,0173099
295	4,112093
295,93	5,470293
297,03	5,8609219
297,96	4,6274872
299,06	8,1288338
300	6,5696855

301,07	7,5721722
302	9,8514214
303,07	7,7675934
304	9,2257004
305,07	11,009752
306	11,829391
307,07	13,871173
308	12,4645
309,07	15,523129
310	14,339871
310,93	18,962545
312,03	17,070396
312,96	17,258221
314,06	18,120907
315	18,098158
315,93	20,913771
317,03	17,507561
317,96	18,623737
319,06	20,820576
320	18,912529
321,07	18,43174
322	19,566961
323,07	22,841408
324	22,411255
325,07	24,837473
326	21,490196
327,07	21,541407

328	22,96417
329,07	22,723557
330	19,661222
331,07	23,653906
332	22,979523
333,07	21,203157
334	22,365196
335,07	22,016041
336	26,683023
337,07	23,174603
338	24,346405
339,07	22,662441
340	23,428663
341,07	21,549675
342	24,983776
343,07	23,859087
344	22,101326
345,07	23,229912
346	20,702635
347,07	20,032051
348	23,966166
349,07	20,859278
350	19,847328
351,07	19,649984
352	21,767382
353,07	19,710905
354	20,58688

355,07	19,495798
356	17,689419
357,07	16,882914
358	18,018019
359,07	17,976456
360	19,851116
361,07	17,392746
362	17,35791
363,07	16,806723
364	15,746754
365,07	12,846947
366	14,967259
367,07	14,705882
368	16,445793
369,07	12,760659
370	13,132296
371,07	14,386239
372	11,708099
373,07	11,639185
374	13,236481
375,07	11,223522
376	10,800508
377,07	9,0304184
378	10,199279
379,07	9,6420984
380	9,7025604
381,07	7,5877333

382	7,9389791
383,07	8,9341688
384	7,6875772
385,07	7,2486606
386	8,6221476
387,07	7,1162868
388	6,7716537
389,07	6,3806033
390	5,6612673
391,06	5,6342835
391,96	5,2918801
393,03	6,1930156
393,93	5,4469724
395	5,5728569
396,06	4,5278139
396,96	6,1221204
398,03	4,3777361
398,93	4,6163645
400	5,1919446
401,07	3,6989386
402	4,5402951
403,07	3,792876
404	3,4085374
405,07	3,5615995
406	5,348516
407,07	3,4788108
408	2,2349935

409,07	4,0899796
410	2,1459227
411,06	3,2689915
411,96	3,4580321
413,03	3,1560676
413,93	1,9908117
415	2,3518345
416,06	1,2341869
416,96	1,9295707
418,03	2,3205445
418,93	1,6178613
420	2,3558977
421,07	1,6798253
422	3,1786397
423,07	2,4235082
424	3,2644179
425,07	1,784266
426	2,3873947
427,07	0,484731
428	2,3521507
429,07	1,2275587
430	1,8984338
431,06	1,7096673
431,96	0,6330116
433,03	1,8450185
433,93	1,2917811
435	1,6765736

436,06	2,1885259
436,96	1,8706157
438,03	1,8334607
438,93	0,9229349
440	2,1045816
441,06	1,2338063
441,96	0,7593014
443,03	1,6069421
443,93	2,0404961
445	0,771605
446,06	0,4884403
446,96	1,1041009
448,03	0,7662835
448,93	2,0414572
450	2,0283976
451,06	2,0211444
451,96	1,2378153
453,03	0,6609386
453,93	0,4619649
455	1,1004559
456,06	2,093735
456,96	0,9489167
458,03	0,3063256
458,93	1,5671525
460	1,1976048
461,06	0,9326908
461,96	1,7504773

463,03	0,6545573
463,93	-0,156274
465	0,4762661
466,06	0,7638252
466,96	1,2816405
468,03	0,6194827
468,93	1,0847669
470	0,9453285
471,04	1,4146495
471,94	0,632511
472,98	-0,622859
474,02	-0,335514
475,07	0,4649721
475,97	0,462606
477,01	2,1618283
478,05	1,0822511
478,95	0,4740085
480	1,0590016
481,06	1,5379883
481,96	0
483,03	0
483,93	-0,457387
485	-1,076095
486,06	0,6295247
486,96	1,059322
488,03	0,4566905
488,93	0,9237875

490	0,1534684
491,04	1,0862819
491,94	0,656168
492,98	1,299334
494,02	1,9117414
495,07	0,9223674
495,97	0,6123698
497,01	1,295127
498,05	0,463392
498,95	0,4725153
500	1,1067194
501,06	1,2343774
501,96	0,4612546
503,03	0,9326908
503,93	1,4548981
505	0,6466214
506,06	-0,168464
506,96	1,4312978
508,03	1,0664771
508,93	0,9303768
510	0,3146138
511,04	0,1624959
511,94	0
512,98	-0,316756
514,02	0,9710309
515,07	0,1600256
515,97	0,4640371

517,01	0,3085943
518,05	0
518,95	1,4548981
520	0,1587301
521,04	0,1534684
521,94	0,3137255
522,98	0,9435446
524,02	0,9513239
525,07	0,331675
525,97	0,3074085
527,01	1,2202562
528,05	1,2296342
528,95	-0,316556
530	0
531,02	-0,313824
532,05	-0,159109
532,94	0,3121586
533,97	0,8106356
535	-0,979592
536,02	0,1647175
537,05	-0,316306
537,94	-0,478316
538,97	0,8307028
540	0,163292
541,04	0,3407155
541,94	0,9280742
542,98	0,483559

544,02	0,9193993
545,07	1,552072
545,97	0
547,01	0,8046347
548,05	2,4566002
548,95	1,1118171
550	4,4388075
551,04	7,8247266
551,94	12,483788
552,98	18,330606
554,02	26,963474
555,07	40,281975
555,97	48,227867
557,01	62,106792
558,05	77,959122
558,95	91,08622
560	102,93159
561,02	113,03657
562,05	125,84232
562,94	125,15923
563,97	128,04216
565	112,88538
566,02	96,880394
567,05	74,445702
567,94	56,388527
568,97	38,321457
570	26,512144

571,02	16,5903
572,05	9,6558161
572,94	5,3234396
573,97	2,8776977
575	1,7921147
576,02	0
577,05	1,0952903
577,94	2,4295433
578,97	1,2712538
580	0,8169935
581,02	2,1731863
582,05	1,429479
582,94	2,6088374
583,97	1,5335071
585	1,7868747
586,02	1,3901762
587,05	2,1940134
587,94	0,7864108
588,97	1,7880365
590	2,8146989
591,02	0,9624639
592,05	1,2678288
592,94	1,5745552
593,97	2,617398
595	2,5669823
596,02	2,677587
597,05	2,3368127

597,94	3,2190568
598,97	1,7268445
600	2,6446795
601,01	1,4124293
602,02	2,6967003
603,04	2,8422549
604,05	2,5050886
605,07	3,1821797
605,94	4,3216548
606,95	3,450439
607,97	2,5469596
608,98	4,9276252
610	2,1964231
611,02	2,1594684
612,05	4,1390729
612,94	4,347826
613,97	4,4692736
615	2,919708
616,02	3,7797863
617,05	3,9625931
617,94	4,8558898
618,97	5,9993687
620	4,3952465
621,01	3,9247749
622,02	5,3400345
623,04	5,2296128
624,05	4,6547713

625,07	4,6325879
625,94	3,7920682
626,95	4,436698
627,97	4,0032024
628,98	3,8247013
630	5,870513
631,01	2,5169106
632,02	4,5744157
633,04	4,7146802
634,05	3,876595
635,07	3,6294777
635,94	4,8046126
636,95	3,0794165
637,97	3,1142948
638,98	5,2505965
640	3,8647342
641,01	3,0640218
642,02	3,889159
643,04	4,8441787
644,05	4,0944881
645,07	3,7891269
645,94	5,5555558
646,95	3,3865507
647,97	3,2701113
648,98	3,1710799
650	3,6618371
651	3,6507936

652	3,4965034
653	2,9996843
654	3,494282
655	4,3625789
656	4,2421279
657	4,026638
658	3,6329174
659	4,6608806
660	4,0466924
661,01	3,7641156
662,02	3,4018865
663,04	2,5425076
664,05	3,6311967
665,07	2,3400934
665,94	3,7494142
666,95	3,5324836
667,97	2,9217284
668,98	2,3488882
670	2,4338303
671	2,9194837
672	3,4337444
673	2,7967682
674	3,3893082
675	3,6095419
676	2,9544394
677	2,331727
678	2,7790644

679	2,3209035
680	2,8306336
681	2,5898843
682	2,750191
683	2,1584952
684	2,4566252
685	2,2243407
686	3,5098429
687	3,4591196
688	3,5714285
689	2,2030165
690	1,5382248
691	1,2182122
692	2,3455825
693	2,4638126
694	2,2036834
695	1,8694501
696	2,9883611
697	2,5348542
698	2,1138456
699	3,0044274
700	1,996008