



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBACENTRO DE CIÊNCIAS
AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
ANIMAL**

FRANCISCO DE ASSIS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Salmonella*
enterica SOROTIPO GALLINARUM BIOVARES
GALLINARUM E PULLORUM ASSOCIADAS A SURTOS
DE SALMONELOSE AVIÁRIA NO BRASIL.**

**AREIA
2022**

FRANCISCO DE ASSIS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Salmonella*
enterica SOROTIPO GALLINARUM BIOVARES
GALLINARUM E PULLORUM ASSOCIADAS A SURTOS
DE SALMONELOSE AVIÁRIA NO BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira.

Coorientadora: Dra. Elma Lima Leite.

**AREIA
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48c Oliveira, Francisco de Assis de.
Caracterização genômica de Salmonella entérica
sorotipo Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum
associadas a surtos de salmonelose aviária no Brasil /
Francisco de Assis de Oliveira. - Areia:UFPB/CCA, 2022.
61f. : il.

Orientação: Celso José Bruno de Oliveira.
Coorientação: Elma Lima Leite.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência animal. 2. Tifo aviário. 3. Pulorose. 4.
Genes de virulência. I. Oliveira, Celso José Bruno de.
II. Leite, Elma Lima. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA CDU 636.09(043.3)



FRANCISCO DE ASSIS DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA DE *Salmonella enterica* SOROTIPO GALLINARUM BIOVARES GALLINARUM E PULLORUM ASSOCIADAS A SURTOS DE SALMONELOSE AVIÁRIA NO BRASIL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano.

APROVADA EM 23/02/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. ELMA LIMA LEITE

UFPB

Coorientadora

Dr. MAURO DE MESQUITA SOUSA SARAIVA

UNESP

Examinador

Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

UFMG

Examinador

A minha família, em especial minha mãe Sebastiana de Oliveira e meu pai *in memoriam* (Cícero Severino de Oliveira) e minhas tias Neuza Maria da Conceição e Maria Nazaré de Oliveira.

Agradecimentos

A Deus pela vida e oportunidade de vivenciar todos esses momentos. A Universidade pela infraestrutura para realização do estudo. Aos meus pais pelo apoio durante minha formação e pelo empenho para que pleiteie meu objetivo e por acreditarem em meus sonhos. E a meus irmãos por me compreenderem em diversos momentos.

Meu pai (*in memoriam*), embora fisicamente ausente, sentia sua presença ao meu lado dando-me força.

Ao professor do Curso da UFPB, Celso José Bruno de Oliveira por ter me aceitado como orientando e conduzido o estudo com maestria, em especial, à Elma Lima Leite minha coorientadora e Priscylla Carvalho colega de laboratório, por todas as contribuições ao longo do estudo para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da UFPB, ao secretário do PPGcan, pela presteza e atendimento quando nos foi necessário.

Aos colegas de classe pelos momentos de amizade e apoio mesmo com encontros sendo síncronos através de plataformas digitais. A Capes pelo financiamento dos estudos.

Ao Laboratório de Produtos de Origem Animal pela assistência nas condutas das avaliações e nas decisões.

A banca avaliadora de defesa pelas valiosas contribuições e sugestões dadas. E por fim a todos que me ajudaram direta ou indiretamente.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO DE ASSIS DE OLIVEIRA, Nascido em Areia-PB, Graduado em Bacharelado em Agroindústria pela Universidade Federal da Paraíba (2018), Técnico em Nutrição e Dietética (2018) pelo Colégio Agrícola Vidal de Negreiros (CAVN-UEPB), Técnico em Enfermagem (2016) pelo IRTEC, Remígio-PB. Monitor Bolsista da disciplina de Química Orgânica (2016), Microbiologia de Alimentos (2017). Estágio extracurricular no Laboratório de Microbiologia (2018) UEPB, Campus III. Área de atuação controle de qualidade dos alimentos, microbiologia e biologia molecular.

RESUMO GERAL

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum) e biovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum) são responsáveis por infectar principalmente aves jovens causando alta mortalidade levando a sérios problemas na avicultura mundial. O objetivo deste trabalho foi relatar as sequências genômicas de *S. Gallinarum* 4295/02 e *S. Pullorum* 20811/12 isoladas de galinhas poedeiras no Brasil, e avaliar a relação filogenética desses isolados bacterianos, bem como a presença de potenciais fatores de virulência. Para isso, os genomas foram sequenciados em plataforma Illumina MiSeq. A tipagem de sequência multilocus (MLST) e as características estruturais relacionadas à predição de genes de virulência foram determinadas por análises de bioinformática. Esses genomas foram agrupados em 34 e 36 contigs com 52,2% e 52,1% de GC e pertencem à sequência tipo 78 (ST78) e 92 (ST92), respectivamente. Foram identificados 23 genes de virulência de *Salmonella* (*invA*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *sptP*, *hilC*, *hilA*, *hilD*, *orgA*, *sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sipB*, *sopB*, *lpfC*, *spvB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, e *ssc*) presentes no biovar Pullorum, enquanto que destes apenas os genes (*sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sopB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse* e *ssc*), foram distribuídos no biovar Gallinarum. A análise filogenética dos biovars demonstrou clados distintos entre as cepas *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* sugerindo eventos evolutivos com pouca divergência evolutiva entre as cepas. Os resultados indicam a ocorrência de cepas pertencentes aos biovars estudados associadas a surtos de Febre Tifoide e Pulorose circulando há décadas no Brasil. Assim, esses dados podem contribuir tanto para uma melhor caracterização desses biovars quanto para estudos sobre a patogenicidade de *Salmonella*, bem como auxiliar em futuras investigações em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: tifo aviário; pulorose; sequenciamento do genoma completo; genes de virulência; análise filogenética.

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (S. Gallinarum) e biovar Pullorum (S. Pullorum) are responsible for infecting mainly young birds causing high mortality leading to serious problems in the poultry industry worldwide. The objective of this work was to report the genomic sequences of S. Gallinarum 4295/02 and S. Pullorum 20811/12 isolated from laying hens in Brazil, and to evaluate the phylogenetic relationship of these bacterial isolates, as well as the presence of potential virulence factors. For this, the genomes were sequenced on an Illumina MiSeq platform. Multilocus sequence typing (MLST), and structural features related to the prediction of virulence genes were determined by bioinformatics analyses. These genomes were grouped into 34 and 36 contigs with 52.2% and 52.1% GC and belong to sequence type 78 (ST78) and 92 (ST92), respectively. 23 *Salmonella* virulence genes were identified (*invA*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *sptP*, *hilC*, *hilA*, *hilD*, *orgA*, *sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sipB*, *sopB*, *lpfC*, *spvB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, *e ssc*) present in the Pullorum biovar, while of these only the genes (*sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sopB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc*) were distributed in the Gallinarum biovar. Phylogenetic analysis of the biovars demonstrated distinct clades between S. Gallinarum and S. Pullorum strains suggesting evolutionary events with little evolutionary divergence between the strains. The results indicate the occurrence of strains belonging to the studied biovars associated with outbreaks of fowl typhoid and pullorum disease circulating for decades in Brazil. Thus, these data can contribute both to a better characterization of these biovars and to studies on the pathogenicity of *Salmonella* as well as assisting in future investigations in epidemiological studies.

Keywords: fowl typhoid; pullorum disease; whole-genome sequencing; virulence genes; phylogenetic analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

Pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i> - Sequenciamento Completo do Genoma
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	RNA Ribossomal
tRNA	RNA de Transferência
GC	Guanina Citosina
%	Porcentagem
SG	<i>Salmonella</i> Gallinarum sorovar Gallinarum biovar Gallinarum
SP	<i>Salmonella</i> Pullorum sorovar Gallinarum biovar Pullorum
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenicity Island
SSTT	Sistema de Secreção do Tipo III
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
RS	Rio Grande do Sul
MG	Minas Gerais

GO	Gene Ontology
VFDB	Virulence Factor Database
CDSs	Sequências de DNA Codificantes
MLST	Multilocus Sequence Typing - Tipagem de Sequência Multilocus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
GenBank	Genetic Sequence Database
PATRIC	Resource Integration Center
BRIG	Ring Image Generator
PLfam	Proteína de Família Específica de Gênero
PGfam	Proteína de Família de Gênero

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação circular do Genoma de *Salmonella* Gallinarum ST78 e *Salmonella* Pullorum ST92.....54

Figura 2: SPIs presentes entre os genomas de *Salmonella* Gallinarum ST78 e *Salmonella* Pullorum ST92, através do BRIG 55

Figura 3: Árvore filogenética das cepas *Salmonella* Gallinarum ST78 e *Salmonella* Pullorum ST92.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da montagem e anotação do genoma de <i>Salmonella</i> Gallinarum ST78e <i>Salmonella</i> Pullorum ST92	50
Tabela 2: Genes de resistência antimicrobiana anotados por CARD e fatores de virulência porVFDB em estirpes de <i>S. Gallinarum</i> ST78 e <i>S. Pullorum</i> ST92 isoladas de galinhas poedeiras no Brasil	51
Tabela S1: Dados complementares acerca dos biovars Gallinarum 4295/02 (ST78) e Pullorum 20811/12 (ST92) isoladas no Brasil	57
Tabela S2: Genomas pertencentes aos biovars Gallinarum ST78 e Pullorum ST92 utilizados para a construção da árvore filogenética com seus respectivos números de acesso aos bancos de dados públicos. Acesso: servidor FTP do NCBI (ftp://ftp.ncbi.nih.gov) e http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica ...	58

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	16
2.1 Gênero <i>Salmonella</i> spp. e salmoneloses aviárias.....	16
2.2 Epidemiologia e aspectos evolutivos dos biovars Gallinarum e Pullorum.....	19
2.3 Análises in silico do sorovar Gallinarum.....	21
2.4 Fatores de virulência.....	22
3 REFERÊNCIAS.....	25
 GENOMIC CHARACTERIZATION OF <i>SALMONELLA</i> GALLINARUM BIOVARs GALLINARUM AND PULLORUM ASSOCIATED WITH POULTRY SALMONELLOSIS IN BRAZIL.....	
Abstract.....	34
1.INTRODUCTION.....	35
2. MATERIAL AND METHODS	36
2.1 Bacteria.....	36
2.2 DNA extraction and sequencing Assembly, and Annotation.....	37
2.3 Genome assembly and annotation.....	37
2.4 <i>In silico</i> analysis.....	37
2.5 Phylogenetic analysis.....	38
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	38
4. CONCLUSION.....	41
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

Salmonella é uma bactéria zoonótica patogênica capaz de causar doenças infecciosas em humanos e animais associadas a sérios prejuízos econômicos na indústria alimentícia e na saúde pública em todo o mundo (SHIVAPRASAD, 2000; JONES et al., 2001; KANG et al., 2011; WANG et al., 2020, SUN et al., 2021). A definição e a classificação sorológica com base em antígenos flagelares e somáticos permitem a distinção, atualmente, de mais de 2600 sorovares pertencentes ao gênero (LAWLEY et al., 2006; GUIBOURDENCHE et al., 2010; LOU et al., 2019; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Dentre estes, *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum destaca-se como um patógeno hospedeiro-específico que infecta apenas aves (WANG et al., 2020).

Este sorovar, por sua vez, é subdividido em dois biovars a saber: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum) e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum), sendo responsáveis por doenças septicêmicas como a tifo aviária infectando, principalmente, aves adultas e a pulorose, uma doença bacteriana aguda que afeta diversas espécies de aves, ambas caracterizando-se como um grave problema para indústria avícola (SHIVAPRASAD, 2000; SORIA, SORIA e BUENO, 2012; XIONG et al., 2018; HU et al., 2019; Le BOUQUIN et al., 2020; SUN et al., 2021;).

É sabido que a evolução de *Samonella* como patógeno é relacionada com a aquisição de elementos genéticos, a exemplo de: plasmídeos fímbrias e ilhas de patogenicidade (do inglês: *Salmonella pathogenicity islands* - SPIs), por meio de processos como a transferência horizontal de genes (GROISMAN e OCHMAN, 1997; TREVOR D LAWLEY, 2006, ZHANG et al., 2018). Entretanto, a maioria dos genes que codificam esses vários fatores de virulência estão inseridos nas regiões das SPIs distribuídas pelo cromossomo bacteriano (GROISMAN e OCHMAN, 1997; ZHANG et al., 2018).

As SPIs mais bem reportadas são as SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5 (KANIGA, TROLLINGER e GALLÁN, 1995; RYCHLIK et al., 2009), não obstante, os fatores de virulência mais bem caracterizados em *Salmonella* são os associados as SPI-1 e a SPI-2, devido a eventos de translocação de proteínas efetoras de virulência que estão ligadas a processos de invasão de células hospedeiras e aos processos de multiplicação intracelular bacteriana (GROISMAN e OCHMAN, 1997).

Notadamente, é importante destacar que a grande maioria das informações que sabemos, até o momento, acerca desses fatores de virulência foram obtidos de estudos que utilizaram como modelo: camundongos, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* em associação com animais conhecidos como grandes reservatórios de *Salmonella* spp., como: aves, bovinos e suínos (LOU et al., 2019).

Diante do exposto, pelo fato dos genes de virulência desempenharem um papel crucial na patogenicidade de *Salmonella* e haver ainda poucos relatos quanto a distribuição de genes de virulência em ambos os biovars de *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum* que estão disponíveis na literatura, nós avaliamos a presença de potenciais genes de virulência de *Salmonella* distribuídos entre esses dois isolados reportados neste estudo.

Ainda, neste trabalho, exploramos a história evolutiva entre os biovars por meio de dados de sequenciamento do genoma completo (do inglês: *Whole Genome Sequence* -WGS). Essas análises, *in silico*, nos permitiu inferir a relação filogenética entre esses dois isolados bacterianos em resolução de nível de base única (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*-SNPs).

Assim, o principal objetivo deste estudo foi investigar os genomas de *Salmonella Gallinarum* ST78 e *Salmonella Pullorum* ST92 isoladas de galinhas no Brasil para caracterização filogenética e identificação de potenciais fatores de virulência.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Gênero *Salmonella* spp. e salmoneloses aviárias

Desde sua descoberta por Daniel Elmer Salmon e Theobald Smith em 1885 (SALMON e SMITH, 1886), o gênero *Salmonella* tem ganhado destaque corroborando ao crescimento exponencial no número de estudos, devido sua patogenicidade para animais e seres humanos, diversidade de sorovares, complexidade epidemiológica e biológica, em função dos aspectos evolutivos e adaptação aos diferentes hospedeiros. Nesse aspecto, há sorovares que infectam apenas animais e outros que infectam apenas humanos, além de um vasto número de sorovares capazes de causar infecções em ambos e, portanto, são relevantes para a saúde pública (WU et al., 2005).

O gênero *Salmonella* spp. é dividido em seis subespécies, sendo que *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* contendo, cada uma, diversos sorovares, atualmente mais de 2.600 (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2017), a complexidade referida entre gênero, espécie e sorotipos de *Salmonella* pode ser compreendida através das ferramentas tecnológicas para uniformidade taxonômica, tendo como base o sistema Kauffmann White (SALMON e SMITH, 1985, KAUFFMANN 1996, ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae (KAUFFMANN 1996). Com relação as suas características fisiológicas e morfológicas, estas bactérias são Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, apresentam a forma de bastonetes (0,7 – 1,5 x 2,0 - 5µm) e não formam esporos, estando presentes em animais domésticos e silvestres como: aves, insetos, mamíferos, assim como, em produtos de origem animal como carne, leite e ovos; geralmente envolvidos em Doenças Transmitida por Alimentos (DTA's). Podem apresentar cápsulas e fermentam açúcares como glicose, resultando na formação de gás e ácido e redução de nitrito em nitrato, na maioria dos sorovares, sendo diferente para sorotipos SG e SP (FERREIRA e CAMPOS, 2008; TORPDAHL et al., 2009).

O sorotipo de *Salmonella* Gallinarum biovares Gallinarum e Pullorum apresentam bioquimicamente características divergentes, como descarboxilação da ornitina para *Salmonella* Pullorum e fermentação do carboidrato dulcitol para *Salmonella* Gallinarum, a qual pode ser usado como critério de diferenciação a nível bioquímico e prova de distinção, desses sorovares, a nível antigênico pertence ao grupo D e antígeno somático "O" ao isolar, demonstrando crescimento lento de bactérias e formação de H₂S, se durante o cultivo, fizer uso do meio apropriado a espécie (TRABULSI; EDWARDS, 1962; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO 2009; BERCHIERI JÚNIOR, 2012).

A hibridização do DNA revela que todos os subgêneros e sorotipos estão relacionados em nível de espécie (ROSSETTI, 2006). A classificação e taxonomia das bactérias sofre mudanças ao longo dos anos baseada na espécie bacteriana e os aspectos evolutivos da mesma considerando a prevalência do gênero e hospedeiro. Sendo necessário o uso de técnicas específicas e metodologias para o isolamento e identificação da espécie aceitas pelos órgãos competentes (ANVISA, OMS, CDC) (CROSA et al., 1973, MINOR e POPOFF, 1987; BOYD et al, 1996; BRENNER et al., 2000; BRASIL, 2012).

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. assumem importância na cadeia produtiva animal e vegetal podendo estar presente nos produtos e derivados contaminados, em decorrência de sua importância em saúde pública e produção animal (BARROS, LIMA,

STELLA, 2020). O sorovar *Salmonella* Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum não são flagelados e, portanto, são imóveis, tendo predileção por órgãos do hospedeiro (fígado, baço, coração) podendo afetar o trato gastrointestinal (QUINN, et al., 2005; VIEIRA 2009; CDC, 2017).

As salmoneloses aviárias causadas pelo biovars Gallinarum e Pullorum são o tifo aviário e Pulorose respectivamente, e ambas enfermidades podem se apresentar através de sinais clínicos ou subclínicos nos animais contaminados, podendo apresentar portadores assintomáticos, disseminando o patógeno no ambiente veiculados pelas diferentes vias de contaminação (vertical, horizontal, transovariana, aerógena) para as aves (BERCHIERI JR et al., 2001; BARROW e FREITAS NETO, 2011; PALMEIRA et al., 2016).

A diferença de ambientes e tempo em que a *Salmonella* pode sobreviver é diversa por suas características, porém, esses biovars *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum tem como hospedeiro específico, as aves, sendo em o biovar Gallinarum com predição para aves adultas ou semi-adultas e o biovar Pullorum acometendo principalmente aves jovens, podendo causar tifo aviário (*Salmonella* Gallinarum) e pulorose (*Salmonella* Pullorum) podendo ou não apresentar sintomas, os tornando disseminadores do patógeno (BERCHIERI JÚNIOR, 2007; MARTINS et al., 2015; BARROS, LIMA, STELLA, 2020).

Em estudos, foram observadas supressões de componentes codificadores (*tor*) para respiração bacteriana durante a exposição de pH alto em *Salmonella* Pullorum, e na *Salmonella* Gallinarum ausência de regiões pertencentes a motilidade, aderência bacteriana e quimiotaxia que no sistema regulatório da bactéria (PORWOLLIK et al., 2005).

O hospedeiro específico do sorovar Gallinarum são as aves, e pós infectadas através das vias de contaminação pode haver comprometimento da integridade intestinal do hospedeiro, causando infecções sistêmicas agudas ou crônicas, aumentando os índices de mortalidade em animais infectados jovens e adultos e baixo rendimento zootécnico (POMEROY e NAGAJARA 1991; LOPES et al., 2016), apresentando ou não sinais clínicos desencadeados pelos biovars Pullorum e Gallinarum, baseados na caracterização dos sorotipos e potencial de virulência (BRASIL, 2011; PENHA FILHO et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Aves infectadas pelos biovars Gallinarum e Pullorum apresentam queda nos índices zootécnicos e, para melhor controle de *Salmonella* spp. nos sistemas de criação se faz necessário conhecimento epidemiológico, patogênico e características do microrganismo correlacionando com virulência através de pesquisas e técnicas de isolamento e identificação que auxiliem no conhecimento molecular da bactéria em curso, sabendo que ambos sorotipos apresentam

características clínicas semelhantes (SOUMET et al.,1996; OLIVEIRA, 2000; SANTOS et al., 2001; RIZZO, 2017).

2.2 Epidemiologia e aspectos evolutivos dos biovars *Gallinarum* e *Pullorum*

Os biovars de *Salmonella* *Gallinarum* e *Salmonella* *Pullorum* desencadeiam diferentes enfermidades, apesar das semelhanças genéticas e fenotípicas, podendo ser atribuída as habilidades adaptativas da bactéria e modulação do gene de virulência de acordo com suas necessidades metabólicas ao utilizar diferentes nutrientes durante a infecção (FENG et al., 2013; DHANANI et al., 2015; CUNHA-NETO et al., 2018).

As mutações adquiridas pelo biovar evolutivamente podem afetar o fenótipo da bactéria e a confiabilidade das mutações agrupadas entre as cepas de importância epidemiológica. A investigações epidemiológicas vem sendo estudadas ao longo dos anos e através de ferramentas de bioinformática e estudos in silico, como caracterização do genoma completo de bactérias, pode ser investigada a relação filogenética entre *Salmonella* *Pullorum* e *Salmonella* *Gallinarum* (LAWLEY et al.,2006; GUIBOURDENCHE et al., 2010; LOU et al., 2019).

Esses biovars compartilham características de um ancestral em comum, a *Salmonella enteritidis* sendo necessário investigações epidemiológicas para identificar características que as diferem dos seus ancestrais, como proteína específica, plasmídeo, devido a transferência horizontal de genes, permitindo observar a evolução dos patógenos emergentes em sua homologia genética e heterologia fenotípica (CRICHTON e OLD, 1990; OLSEN et al., 1996; GEMMA et al., 2015).

A divergência entre as cepas bacterianas ao longo dos anos pode estar associada aos aspectos evolutivos entre as linhagens e sua distribuição geográfica como também ao seu índice de propagação no país ou na região devido as rotas de transmissão, vertical ou horizontal e inadequações de biossegurança (RODRIGUES, 2011). As cepas de gênero *Salmonella* podem apresentar heterogeneidade fenotípica podendo ser atribuída ao nicho encontrado nas células do hospedeiro desencadeando infecção e se tornando de extrema importância epidemiológica e em aspectos evolutivos para melhor compreensão da patologia causada (HU et al., 2019).

Com o surgimento e evolução da *Salmonella* devido a aquisição e perda de genes (dinâmica de genes) no genoma e organização no conteúdo genético refletido na bactéria podendo ser caracterizada pela perda ou aquisição de genes não essenciais para redução, restrição ao hospedeiro, como é o caso das bactérias *Salmonella* biovar Gallinarum e *Salmonella* biovar Pullorum, devido adaptação ao nicho encontrado no hospedeiro e aquisição de habilidade de causar infecção (DOBRINDT e HACKER, 2001; THOMSON et al., 2008).

O uso de antimicrobianos de classes variadas ou única de maneira indiscriminada, sem orientação profissional dos riscos, pode estar associado à disseminação de bactérias que apresentam resistência a antimicrobianos usados na avicultura, devido a deleção de bactérias sensíveis e seleção de cepas resistentes e características determinantes de virulência importantes na bactéria para compreender o potencial de virulência da bactéria em causar infecção no hospedeiro e ineficiência do antimicrobiano frente ao agente etiológico causador da infecção (GOULD, 2008).

De acordo com Thomson et al. (2010), o biovar de *Salmonella* Gallinarum apresenta 4659 Mpb e 309 pseudogenes enquanto que o biovar de *Salmonella* Pullorum apresentam 75 pseudogenes, dos quais maior parte (80%) apresenta sítio de inativação homólogo e menor parte (20%) heterólogo e atribuíram essas diferenças às especificidades encontradas pela bactéria no hospedeiro.

As diferenças encontradas entre as estirpes podem conferido em perda funcional do gene, com relevância para especificidade do sorovar no hospedeiro e propondo que, pequena quantidade de genes é suficiente para causar infecção sistêmica no desenvolvimento da enfermidade (FENG et al., 2013).

Evolutivamente, ambos os biovars Gallinarum e Pullorum mostraram uma especificidade ao hospedeiro em associação com genes de virulência (QUINN et al., 2005). Assim, considerando os aspectos evolutivos do agente etiológico dos biovars e os mecanismos genéticos dos microrganismos podem ter levado os biovars de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum a restrição de hospedeiros, despertando interesse nos pesquisadores, por apresentarem diferentes doenças e especificidade de hospedeiro (LI et al., 1993; OLSEN et al., 1996; BATISTA, 2013).

2.3 Análises *in silico* do sorovar *Gallinarum*

As técnicas para detecção de genes e fatores de virulência em bactérias têm ganhado espaço ao longo dos tempos, através de métodos convencionais e métodos sofisticados em busca de melhor confiabilidade e precisão em seus diagnósticos, reduzindo assim, possíveis erros e ambiguidades nos diagnósticos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e WGS. O sequenciamento do genoma bacteriano tem acrescentado aos conhecimentos dos pesquisadores que complementa essas técnicas com alta eficiência e confiança nos estudos, a análise de genoma completo possibilita seu uso em diversos campos, incluindo a tipagem molecular (TASMIN et al., 2017).

O avanço tecnológico de sequenciamento do genoma é proporcionado principalmente pelo avanço concomitante da área da bioinformática, na qual utiliza algoritmos computacionais para gerenciar e lidar com os dados moleculares, para agrupar as sequências geradas em trechos ininterruptos cada vez maiores, pressuposto pela montagem referencial a algum modelo evolutivamente próximo. O sequenciamento genômico proporciona uma análise meticulosa do conteúdo genético, a comparação entre os genomas de *Salmonella* *Gallinarum* e *Salmonella* *Pullorum* pode auxiliar na compreensão das doenças causadas pelos mesmos, tifo aviário e pulorose (EKBLÖM e WOLF, 2014).

Pesquisas realizadas por Olsen et al. (1996) diante de testes como IS200, ribotipagem e eletroforese de campo pulsado, observaram que estirpes de *Salmonella* *Gallinarum* e *Salmonella* *Pullorum* apresentaram internamente padrão molecular idêntico e agrupamento por perfil genético e diferentes grupos.

O fenótipo e o perfil isoenzimático o sorovar *Gallinarum* pode apresentar rearranjos no genoma, ainda neste sentido, o uso do WGS harmoniza a visualização do genoma bacteriano com alto grau de resolução, consentindo não só comparações com epidemiologia genômica, mas também a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, aspectos evolutivos ligados a evolução dos microrganismos, assim como características de virulência (WALKER et al., 2013).

As biovars *Gallinarum* e *Pullorum* compartilham muitas de suas características fenotípicas e genotípicas por seu alto grau de semelhança (VAID et al., 2021). Devido à diferenciação entre elas, a WGS pode ampliar os conhecimentos existentes sendo um

método confiável, em estudos epidemiológicos para diferenciar isolados bacterianos de *Salmonella* spp. permitindo a detecção de alterações em poucos nucleotídeos e pseudogenes identificando gene ou genes específicos que auxiliem no mecanismo do agente etiológico detalhado no hospedeiro (WANG et al., 2020).

Atualmente, as metodologias usadas para identificar características do patógeno elaborado a partir de software específico, com conteúdo de dados obtidos em conjunto ou individual através de técnicas específicas (eletroforese, PCR, identificação de plasmídeos e susceptibilidade a antimicrobianos) e analisados em conjunto para determinar a similaridade genética com finalidade de identificar características bacteriana que auxiliem na compreensão na presença ou ausência de genes de virulência no DNA da bactéria (SAJID e SCHWARZ, 2009).

Ainda, o sequenciamento genômico possibilita a comparação de um ou mais fragmentos de DNA obtidos da bactéria em análise sem haver necessidade de sequenciar todo o seu genoma, através dos dados existentes em plataformas (GenBank, NCBI) do sequenciamento dos gêneros e sorotipo a partir da similaridade genética e filogenia (SHAHADA et al., 2011).

2.4 Fatores de virulência

De acordo com Ohl e Miller (2001), os genes codificadores de fatores de virulência podem estar presentes no cromossoma do agente etiológico, as ilhas de patogenicidade e elementos genéticos transmissíveis e nessas regiões podem ser codificados fatores de virulência específicos responsáveis pela facilidade de invadir e colonizar a célula do hospedeiro, favorecendo eventos posteriores que auxiliem na instalação da patologia (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005; GIBSON et al., 2007).

A habilidade dos biovars Gallinarum e Pullorum em causar doenças depende de uma gama de fatores de virulência presentes no cromossomo ou no plasmídeo (GIBSON et al., 2007), de maneira que, a composição plasmidial e os fatores de virulência se proliferam independente do nicho cromossomal presente na célula e fatores de virulência para os processos de invasão, adaptação e sobrevivência bacteriana. A dimensão das doenças causadas por *Salmonella* envolve alguns mecanismos que operam em ações coletivas, entre eles os fatores virulência presentes em sequências cromossomais onde podemos identificar genes relevantes para sua patogênese (JEONG et al., 2008).

Assim, existem uma gama de fatores de virulência que se associam a patologias causadas por *Salmonella* spp, se fazendo necessário caracterizar a maioria desses fatores, sabendo que a promoção da virulência dos patógenos do gênero se dar com a união das ações e na maioria das vezes são determinados por genes cromossomais, os quais podem ser encontrados nas ilhas de patogenicidade I, no genoma da bactéria patogênica, com características própria ou adquirida da célula que concede desviar do sistema imunológico ou que facilite a infecção no hospedeiro (SCHWARTZ, 2000; VIEIRA, 2009).

E metodologias e técnicas difundidas por Hoffmann et al. (2014), apontam que o WGS é um método confiável, podendo ser usado em estudos para diferenciar isolados bacterianos com similaridades gênicas específicas de *Salmonella* spp., incluindo os sorovar *Salmonella* Gallinarum permitindo detectar alterações em poucos nucleotídeos e pseudogenes presentes no isolado bacteriano e identificação das Ilhas de Patogenicidade (SPIs) nas linhagens de interesse.

A distribuição das ilhas de patogenicidade (SPIs) entre os biovars de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum podem apresentar homologia nas ilhas de patogenicidade com genes de virulência idênticos e sistemas de secreção da bactéria diferentes e através de recursos da bioinformática podemos identificar a presença das ilhas e presença ou ausência de genes de virulência, compreendendo as respectivas funções (GROISMAN e OCHMAN, 1996; MARCUS et al., 2000; RYCHLIK et al., 2009).

Onde pode ocorrer rearranjo genômico, no qual o fenótipo de invasão é verificado por uma quantidade ampliada do conjunto de genes localizados na ilha de patogenicidade-1 (SPI-1), presentes em todas as cepas invasivas de *Salmonella* e seus sorovares, incluindo Gallinarum e biovar Pullorum, sendo esta invasão um importante fator influente na virulência da *Salmonella* (VAID et al., 2021).

Assim, cada gene presente no genoma é responsável por um ou mais mecanismo, os genes *spvC* e *spvB* (plasmídeo de virulência de *Salmonella*) são incubados ao crescimento e interação imunológica respectivamente, o gene fimbrial codificador de plasmídeo (*pefA*) responsável por reconhecer e aderir, assim como auxiliar na invasão e no acúmulo de fluidos da célula no nicho de instalação (ÁLVAREZ, 2007; TORTORA et al., 2000)

Mutações funcionais nos sistemas de secreção tipo III (TTSS) os quais são codificados pelas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* SPI-1 e SPI-2 e suas interações entre *Salmonellas* do sorovar Gallinarum e suas funções na virulência em galinhas. A SPI-1 está relacionada com invasividade nas células das aves e persistência dentro dos macrófagos das células do hospedeiro podendo apresentar virulência total. Já a SPI-2 é invasivo em células não fagocíticas e baixa persistência em macrófagos para virulência permitindo a multiplicação dentro do

sistema reticulo endotelial, podendo ser atenuado nas infecções sistêmicas permitindo tifo aviário e pulrose (JONES et al.,2001).

Os genes de virulência plasmidiais podem estar presente nos biovares de *Salmonella* Gallinarum e Pullorum, e nesses genes podem conter informações essenciais da bactéria que auxiliam na identificação de fatores de virulência presentes na estirpe e estes fatores podem estar relacionado com a necessidade (respiração, locomoção, nutrição) genética para sobrevivência da bactéria (ARBEIT, 1999; SHAH et al., 2005; HU et al., 2019; PALMEIRA et al., 2016).

A perda de plasmídeos em bactérias do gênero *Salmonella* pode ocorrer em eventos ocasionais ao decorrer do tempo, em consistência com o cromossomo ou plasmídeos externos, o que pode levar ao patógeno a aquisição de novas características adaptativas potencializando assim a sua capacidade de infecção (VAID et al., 2021).

3. REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, N.M. Virulência, resistência y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. 2007. 156 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional) - Universidad de Oviedo, Oviedo, 2007.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganism. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F.C; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7 ed. Washington, ASM Press, p.116-137, 1999.

BARROS, I. M.; LIMA, T. F.; STELLA, A.E.; Salmonelose aviária e saúde pública: atualidades e o seu controle no brasil, ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiania, v.17 n.32; p. 458 2020. DOI: 10.18677/EnciBio_2020B42.

BARROW, P.A, FREITAS NETO, O.C. Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathol** 2011;40:1–13. Disponível em:<<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.542575>.>

BATISTA, Diego Felipe Alves. Análise comparativa dos genomas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum 287/91 e Pullorum 449/87 para identificação de regiões de diferenças (RODs). 2013. xii, 77 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/99844>> Acesso em: 14 Julho, 2021.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Controle de salmoneloses mostra resultados no combate ao tifo aviário. Informativo Técnico Avícola - Biovet, 2012, n 42.

BERCHIERI, JR., A., MURPHY, C.K., MARSTON, K. & BARROW, P.A. Observation on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, 2001.30, 221-231.

BOYD, E.F, WANG, F.-S. WHITTAM, T.S E SELANDER, R.K. “Molecular geneticrelationship of the salmonellae,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62,não. 3, pp. 804-808, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* sp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella***. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.

BRASIL. Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos. 1. ed. Agência de vigilância sanitária. Brasília, 2012. 171p. characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from.

BRENNER F. W., VILLAR R. G., ANGULO F. J. TAUXE. R., SWAMINATHAN. B. *Salmonella* Nomenclature: American Society for Microbiology. **Journal of Clinical Microbiology** Volume 38, Issue 7, 1 July 2000, Pages 2465-2467.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Marder, E.P., Cieslak, P.R. e Cronquist, A.B. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** V. 66, P.397–403. doi: disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6615a1>>

CRICHTON, P; OLD, D.C. Salmonellae of serotypes gallinarum and pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene probing. **J Med Microbiol.** 1990. Jul;32(3):145-52. doi: 10.1099/00222615-32-3-145. PMID: 1973735.

CROSA, H, BRENNER, D.J. EWING, W.H. E FALKOW, S. "Molecular relationships between the Salmonellae", *Journal of Bacteriology*, vol. 115, não. 1, pp. 307–315, 1973.

CUNHA-NETO, A. da., CARVALHO, L.A., CARVALHO, R.C.T., RODRIGUES, D.P., MANO, S. B., FIGUEIREDO, E.E.S., CONTE-JÚNIOR, C.A. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, v. 97, n. 4, p. 1373–1381, abr. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3382/ps/pex406>>. Acesso em 13 de Novembro, 2021.

DHANANI, A. S. et al. Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128773, jun. 2015.

DOBRINDT, U.; HACKER, J. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 5, p. 550-557, 2001.

EKBLOM, R. WOLF, J.B.W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary Applications**, 7(9):1026-42. 2014.

FENG, Y; CHU, C; CHIEN, A.CH. U. S, CHU, C.H; CHIU, C.H. Evolution of genes on the *Salmonella* virulence plasmid phylogeny revealed from sequencing of the virulence plasmids of *S. enterica* serotype Dublin and comparative analysis Genomics. 2013; 92: 339–343.

FENG.Y; JOHNSTON, R.N; LIU, G-R, LIU S-L. Genomic Comparison between *Salmonella* Gallinarum and Pullorum: Differential Pseudogene Formation under Common Host Restriction. **PLoS ONE** 8(3): e59427. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059427>. Acesso em: 22 agosto de 2021.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 329-345, 2008.

GEMMA, C. L; MARIA, F; THOMAS, R. C; THERESA; NICHOLAS, F; BRYONY, N, P; HELENA, M.B. SETH-SMITH; LARS, B; ANNA, S; TOM, H; PAUL,W; SARAH, E. P; DUNCAN J, MASKELL; JUKKA, C; JOSE, A. C; PAUL, B; JULIAN, P; GORDON, D; NICHOLAS,R. T. Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. PNAS January 20, 112 (3) 863-868. 2015. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/112/3/863.short>. Acesso em: 22 de Agosto 2021.

GIBSON, D. L; WHITE, A. P.; RAJOTTE, C. M.; KAY, W. W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella*. 2007.

GOULD, I. M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 2–9, nov. 2008.

GROISMAN, E.A, OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. Trends Microbiol. 1997 Sep;5(9):343-9. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01099-8. PMID: 9294889.

GUIBOURDENCHE, M., ROGGENTIN, P., MIKOLEIT, M., FIELDS, P. I., BOCKEMÜHL, J., GRIMONT, P. A., et al. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res. Microbiol.** 161, 26–29. doi: 10.1016/j.resmic.2009.10.002

HU Y, WANG Z, QIANG B, XU Y, CHEN X, LI Q, JIAO X. Loss and gain in the evolution of the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum genome. 2019. **mSphere** 4:e00627-18. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00627-18>.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S. P. ROGGENTIN, M. MIKOLEIT et al., “Suplemento 2008–2010 (no. 48) ao esquema White-Kauffmann-Le Minor,” *Research in Microbiology* vol. 165, nº 7, pp. 526-530, 2014.

JEONG, J.H; SONG, M; PARK, S.I; CHO, K.O; RHEE J.H; CHOY, H.E. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. **Journal of Bacteriology**, Washington. 2008; v. 190, n. 19, p. 6340- 6350.

JONES, M.A, WIGLEY P, PAGE K.L, HULME SD, BARROW PA. *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Requires the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens. *Infect Immun* 2001;69:5471–6. Disponível em:<<https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5471-5476.2001>>.

KANG M-S, KWON Y-K, JUNG B-Y, KIM A, LEE K-M, AN B-K, et al. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. *Veterinary Microbiology* 2011;147:181–5. Disponível em:<<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.039>>.

KANIGA K, TROLLINGER D, GALÁN JE. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. **Journal of Bacteriology**. 1995 Dec;177(24):7078-7085. DOI: 10.1128/jb.177.24.7078-7085.1995. PMID: 8522512; PMCID: PMC177584

KAUFFMANN, F. *The Bacteriology of Enterobacteriaceae*, Williams & Wilkins, Baltimore, Md, USA, 1966.

LAWLEY TD, CHAN K, THOMPSON LJ, KIM CC, GOVONI GR, et al. (2006) Genome-Wide Screen for *Salmonella* Genes Required for Long-Term Systemic Infection of the Mouse. **PLOS Pathogens** 2(2): e11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020011>

LE BOUQUIN S, BONIFAIT L, THÉPAULT A, LEDEIN T, GUILLON F, ROUXEL S, SOUILLARD R, CHEMALY M. Epidemiological and Bacteriological Investigations Using Whole-Genome Sequencing in a Recurrent Outbreak of Pullorum Disease on a Quail Farm in France. **Animals (Basel)**. 2020 Dec 26;11(1):29. doi: 10.3390/ani11010029. PMID: 33375256; PMCID: PMC7823777.

LOPES, E.S.; MACIEL, W.C.; TEIXEIRA, R.S.C.; ALBUQUERQUE, A.H.; VASCONCELOS, R.H.; MACHADO, D.N.; BEZERRA, W.G.A.; SANTOS, I.C.L. Isolamento de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* de psitacíformes: relevância em saúde pública. **Arq. Inst. Biol.** v. 83, p. 1-10, 2016.

LOU L, ZHANG P, PIAO R, WANG Y. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. **Front Cell Infect Microbiol** 2019;9:270. Disponível em:< <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>>.

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity island: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, 2000. p.145-156.

MARTINS, N.R.S.; SANTOS, R.L.; JUNIOR, A.P.M.; SILVA, N. Cadernos Técnicos de veterinária e zootecnia, **Sanidade Avícola**. nº 76, Belo Horizonte: FEP MVZ, 2015. 140p.

MINOR, L. E.; POPOFF, M.Y. “Designação de *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., como o tipo e única espécie do gênero *Salmonella*: pedido de opinião, ”**International Journal of Systematic Bacteriology** , vol. 37, pp. 465–468, 1987.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

OLIVEIRA, S.D. Detecção e Identificação de *Salmonella* sp., *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em materiais de origem avícola. 2000. 104 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

OLSEN, J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J.; BISGAARD, M. Genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Gallinarum. *Journal of medical microbiology*, Reading, v. 45, n. 6, p. 413-418, 1996.

PALMEIRA, A; SANTOS, L.R; BORSOI, A; RODRIGUES, L.B; CALASANS, M; PARVEJ, M.S; NAZIR, K; RAHMAN, M.B; JAHAN, M; KHAN, M.F.R; RAHMAN, M. Prevalence and characterization of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum and Gallinarum from chicken, *Veterinary World*. 2016; 9(1): 65-70.

PENHA FILHO, R.A.C.; FERREIRA, J.C.; KANASHIRO, A.M.I.; DARINI, A.L.C.; JUNIOR, A.B. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum isolated from ill poultry in Brazil. **Ciência Rural**. v. 46, n. 3, p. 513-518, 2016.

POMEROY, B. S; & NAGARAJA, K. V. Tifóide aviária, 1991. p.87-99. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WM & Yoder Jr, HW (Eds), **Diseases of Poultry**. Iowa State University Press, Ames.

PORWOLLIK, S.; SANTIVIAGO, C. A.; CHENG, P.; FLOREA, L.; JACKSON, S.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content between *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates and comparison to closely related serovars Gallinarum and Dublin. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 18, p. 6545-6555, 2005.

POTTKER, E.S. (2016). Genômica e caracterização fenotípica de bacteriófagos líticos para biocontrole de *Salmonella enterica*. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

QUINN, P.J; MARKEY, B.K; CARTER, M.E; DONNELLY, W.J; LEONARD, F.C. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. 1ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2005, 512p.

RIZZO, NATALIE NADIN. *Salmonella Gallinarum* multirresistentes e formadoras de biofilmes em cascas de ovos são sensíveis a bacteriófagos. **Dissertação mestrado**.2017.77 f.

RODRIGUES, D.P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária. Rio de Janeiro. 2011.

ROSSETTI, M. L. **Doenças infecciosas: Diagnóstico Molecular**. 1ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2006. ISBN: 9788527710831.

RYCHLIK, I., KARASOVA, D., SEBKOVA, A. *et al*. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiol** **9**, 268 (2009). Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>>.

SAJID, S.U; SCHWARZ, S. Plasmid fingerprinting and virulence gene detection among indigenous strains of *Salmonella enterica* serovar enteritidis. Ayub Med Coll Abbottabad. 2009;21(2): 83-86.

SALMON, D. e SMITH, T. “Report on swine plague,” *US Bureau of Animal Industries*. 2º Relatório Anual 184, Escritório de Impressão do Governo dos EUA, Washington, DC, EUA, 1885.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; FLORES, M. L.; PONTES, A. P.; PILOTTO, F.; SILVA, N. N.; SALLE, C. T. P.; LOPES, L. F. F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 29, n. 2, p. 87-92, 2001.

SHAH, D.H; LEE, M.J; PARK, J.H; LEE, J.H. E.O; SK, KWON J.T; CHAE, J.S. Identification of *Salmonella Gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. Microbiology, London. 2005, v.151, p.3957–3968.

SHAHADA, F; AMAMOTO, A; CHUMA, T; SHIRAI, A; OKAMOTO, K. Antimicrobial susceptibility phenotypes, resistance determinants and DNA fingerprints of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from bovine in Southern Japan, *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 30: 150–156.

SHIVAPRASAD HL. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech* 2000;19:405–24. Disponível em: < <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1222>.>

SILVA, A.J.H.; ANJOS, C.P.; NOGUEIRA, L.S.; RIBEIRO, A.C.R.; FRAGA, E.G.S. *Salmonella* spp. um agente patogênico veiculado em alimentos. **Revista do Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 5, n. 1, 2018.

SORIA MC, SORIA MA, BUENO DJ. Comparison of 2 culture methods and PCR assays for *Salmonella* detection in poultry feces. **Poultry Science**. 2012 Mar;91(3):616-626. DOI: 10.3382/ps.2011-01831. PMID: 22334736.

SOUMET, C.; GWENNOLA, E.; FACH, P.; COLIN, P. Evaluation of Different DNA Extraction Procedures for the Detection of *Salmonella* from Chicken Product by Polymerase Chain Reaction. **Letters in Applied Microbiology**. n. 19, p. 294-298. 1996.

SUN F, LI X, WANG Y, WANG F, GE H, PAN Z, et al. Epidemic patterns of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum isolates in China during the past half-century. **Poultry Science** 2021;100:100894. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.007>.>

TASMIN, R. HASAN, N. A, GRIM, C. J et al. Genotypic and phenotypic characterization of multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky strains recovered from chicken carcasses. **Plos one**. 2017 ;12(5):e0176938. DOI: 10.1371/journal.pone.0176938. PMID: 28481935; PMCID: PMC5421757.

THOMSON, N; BARROW, P.A; JONES, M. *Salmonella*. In: GYLES CL, PRESCOTT JF, SONGER G, THOEN CO. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2010. Cap. 14, p 231- 257.

THOMSON, R.; CLAYTON, D. J.; WINDHORST, D.; VERNIKOS, G.; DAVIDSON, S. et al., (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research**, New York, v. 18, n. 10, p. 1624-1637, 2008.

TORPDAHL, M. HAMMERUM, A. M., ZACHARIASEN, C., NIELSEN, E. M. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark, **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, Volume 63, Issue 2, February 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkn492>>.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, 2000. p.83.

TRABULSI, L. R.; EDWARDS, P. R. The differentiation of *Salmonella* Pullorum and *Salmonella* Gallinarum by biochemical methods. The Cornell Veterinarian, Ithaca, v. 52, n. 1, p. 563-569, 1962.

VAID. R. K.; THAKUR. Z.; ANAND. T.; KUMAR. S.; TRIPATHI. B. N. Comparative genome analysis of *Salmonella* enterica serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum decodes strain specific genes. 24 November 2021. **Research Square**. Doi: 10.21203/rs.3.rs-112825/v1. Disponível em:

<<https://www.researchsquare.com/article/rs-112825/v1>> . Acesso em 13 Novembro 2021.

VAN ASTEN, A. J. A. M; VAN DIJK, J. E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 251-259, 2005.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n.4, p. 406-414, 2009.

WALKER, T.M, IP C.L, HARRELL. R.H, et al. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. **The Lancet. Infectious Diseases**. 2013. Feb;13(2):137-146. DOI: 10.1016/s1473-3099(12)70277-3. PMID: 23158499; PMCID: PMC3556524.

WANG X, WANG H, LI T, LIU F, CHENG Y, GUO X, et al. Characterization of *Salmonella* spp. isolated from chickens in Central China. BMC Vet Res 2020;16:299. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12917-020-02513-1>>

Wu K-Y, Liu G-R, Liu W-Q, Wang AQ, Zhan S, Sanderson KE, et al. The genome of *Salmonella enterica* serovar gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. **J Bacteriol** 2005;187:4720–7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JB.187.14.4720-4727.2005>>

XIONG D, SONG L, PAN Z AND JIAO X Identification and Discrimination of *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Biovars Pullorum and Gallinarum Based on a One-Step Multiplex PCR Assay. **Front. Microbiol.** (2018). 9:1718. doi: 10.3389/fmicb.2018.01718.

ZHANG D, ZHUANG L, WANG C, ZHANG P, ZHANG T, SHAO H, et al. Virulence Gene Distribution of *Salmonella* Pullorum Isolates Recovered from Chickens in China (1953–2015). **Avian Diseases** 2018; 62:431. <https://doi.org/10.1637/11927-071318-ResNote.1>

Genomic characterization of *Salmonella* Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum associated with poultry salmonellosis in Brazil

Abstract

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (S. Gallinarum) e biovar Pullorum (S. Pullorum) are responsible for infecting mainly young birds causing high mortality leading to serious problems in the poultry industry worldwide. Here we report the genomic sequences of representative isolates of S. Gallinarum 4295/02 and S. Pullorum 20811/12 strains isolated from laying hens collected in Brazil. Prediction of virulence genes and phylogenetic analysis were performed by downstream bioinformatics analyses. We identified 23 *Salmonella* virulence genes (*invA*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *sptP*, *hilC*, *hilA*, *hilD*, *orgA*, *sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sipB*, *sopB*, *lpfC*, *spvB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc*) present in the Pullorum biovar, while from these only the genes (*sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sopB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc*), were distributed in the biovar Gallinarum. Phylogenetic analysis performed in comparison with other genome sequences belonging to both biovars demonstrated distinct clades for S. Gallinarum and S. Pullorum suggesting evolutionary events that mark a path of little evolutionary divergence between the two biovars when compared with the other clustered isolates from different locations in Brazil and in the world. Furthermore, our results indicate the occurrence of strains belonging to these two biovars associated with outbreaks of Typhoid Fever and Pulatorosis circulating for decades in Brazil. Preliminary sequences of the analyzed genomes showed conserved genomic sequences circulating in Brazil. These data may contribute both to a better characterization of these biovars and to

studies on the pathogenicity of *Salmonella*, as well as help in future investigations on epidemiological studies.

Keywords: *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, Fowl typhoid, Pullorum disease, Whole-genome sequencing, Virulence genes, Phylogenetic analysis.

1. Introduction

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum (*S. Gallinarum*) and Pullorum (*S. Pullorum*) belong to *Salmonella* serogroup D (Capita *et al.*, 2007) and are the etiological agents of fowl typhoid, and pullorum disease, respectively. Both diseases cause huge economic losses to the poultry industry worldwide (Shivaprasad, 2000; Jones *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021; Vaid *et al.*, 2021).

Although these two biovars have been attributed to the same serovar, studies have shown that these strains stemmed from a common ancestor similar to *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (Thomson *et al.*, 2008; Barrow & Freitas Neto, 2011). These biovars have almost identical biochemical characteristics. The few biochemical differences, such as the rapid activity of ornithine decarboxylase observed in *S. Pullorum* have been used as a differentiation method (Crichton & Old, 1990; Liu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005; Sylejmani *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018).

Infections caused by *Salmonella* are driven by several virulence factors associated with regulatory pathways of host adaptability (Zhang *et al.*, 2018). *Salmonella* pathogenicity islands (SPIs) are known to harbor a variety of encoding virulence genes. Although the existence of other elements such as fimbriae, toxins (Foley *et al.*, 2013; Lou *et al.*, 2019), as well as of virulence plasmid related to the virulence of serovars such as Pullorum, Enteritidis and Typhimurium, due as they harbor the *spv* gene, which is associated with

intracellular survival and replication, as well as the process of cellular apoptosis (Gulig *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2018).

Currently, there are 24 well-reported SPIs, among which SPI1, SPI2, SPI3, SPI4 and SPI5 stand out as those associated with bacterial adherence, invasion, intracellular replication, colonization, survival and pathogenicity (Cirillo *et al.*, 1998; Marcus *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2018).

Thus, given the limited availability of well-characterized genomes belonging to these two biovars in public databases, we report herein the genomic sequences of *S. Gallinarum* ST78 and *S. Pullorum* ST92 isolated from laying hens in Brazil, providing original insights on the comparison of virulence factors and the phylogenetic relationship of these isolates.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacteria

Both strains 4295/02 (*S. Gallinarum*) and 20811/12 (*S. Pullorum*) were isolated from flocks of birds with clinical signs of Typhoid Fever and Pullorum Disease in Brazil from 2002 and 2012, respectively (Table S1). These strains were obtained from laying hen (*S. Gallinarum*) and broiler chicken (*S. Pullorum*). These strains were identified by serotyping and biochemical tests at the Oswaldo Cruz Foundation, which are official laboratories associated with the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. The bacteria used in this study were maintained at -80°C until subsequent analysis. For comparative genomic analysis and phylogenetic investigation, we used 49 publicly available genome sequences (Table S2).

2.2 DNA extraction and sequencing Assembly, and Annotation

Genomic DNA was extracted by a commercial kit (DNA Power Soil kit, Qiagen) and quantified by fluorometry (Qubit, LifeTechnologies, Carlsbad, CA, United States). DNA libraries were prepared using the Nextera XT library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, United States). Fragment sizes were evaluated using a capillary electrophoresis system (Fragment Analyzer, Agilent, Germany), and paired-end sequencing was performed on an Illumina MiSeq (Illumina, Carlsbad, CA, United States) using a 600 cycles (2 × 300) v3 kit.

2.3 Genome assembly and annotation

The quality of raw reads was assessed with the FastQC software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) was used to remove Illumina adaptors and low-quality reads (Phred score <20). The reads were *de novo* assembled using Unicycler (Wick *et al.*, 2017). Contigs were annotated via PATRIC server (Wattam *et al.*, 2017).

2.4 In silico analysis

Multilocus Sequence Typing was performed *in silico* using MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Plasmids contigs were identified by PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). Antibiotic resistance determinants were screened using ResFinder 3.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), and the prediction of virulence genes was performed through the Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (VFDB) platform (Liu *et al.*, 2022). Furthermore, BLAST Ring Image Generator (BRIG) version 3.0 (Alikhan *et al.*, 2011) was used for pathogenicity islands genome comparisons. The circular genomic map was constructed with BLAST + using default parameters. *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 (GenBank accession number [NC_003197.2](#)) was used as the reference genome.

2.5 Phylogenetic analyses

Phylogenetic tree was based on a concatenated nucleotide sequence alignment of the 49 genomes (Table S2) and was predicted from the SNP data set by using CSI Phylogeny 1.4 (Kaas *et al.*, 2014) and validated in combination with the cladogram. The optimal substitution model was inferred from the alignment of SNPs by using jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012). The phylogenetic distances were determined by the Maximum likelihood (ML) method (Felsenstein, 1981) using complete deletion of the gaps and 1,000 bootstrap replicates to generate a consensus tree. Bootstrap values below 50% were not shown at the nodes. The resulting tree was viewed in MEGA6 version 11. *Shigella flexneri* 1235-66 (GenBank accession [AKNF01000780-1](#)) was used as outgroup.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The *S. Gallinarum* genome was assigned as sequence type (ST) 78, and comprised 1,181,400 reads, with 292,987,200 bases of raw sequencing data with an average of 248 bases per read. The assembly generated a high-quality 65,7X-coverage draft genome with 36 contigs, N₅₀ value of 366,906 bp, and N₇₅ value of 165,342 bp. L50 and L75 were 5 and 10, respectively.

The circular genome map is shown in Figure 1(a). The draft genome has 4,456,744 bp, a G+C content of 52.2% and resulted in the identification of gene features with 4 ribosomal RNA (rRNA) and 62 transfer RNA (tRNA). A total of 4,567 DNA coding sequences (CDSs) were annotated including 4,079 functional proteins from which 1,059 proteins were assigned by Gene Ontology (GO), 4,448 proteins with genus-specific family

(PLfam), and 4,482 proteins with cross-genus family (PGfam) assignments. Moreover, 488 hypothetical proteins were identified (Table 1).

The *S. Pullorum* genome was assigned as sequence type (ST) 92. Out of the 385,486,476 total sequenced bases, 1,386,642 reads were obtained with an average of 278 bases per read. Assembly generated a 81,3 X- coverage draft genome with 34 contigs with N₅₀ value of 405,031 bp. The graphical representation of the circular chromosome is shown in Figure 1(b).

A total of 4,876 CDSs were predicted, with the gene length of 4,739,458 bp, with a G+C content of 52.1%. Moreover, 3 rRNAs and 67 tRNAs encoding genes were predicted. The 4,340 functional proteins included 1,071 proteins with Gene Ontology (GO) assignment, 4,754 proteins with genus-specific family (PLfam) assignments and 4,791 proteins with cross-genus family (PGfam) assignments. Other 536 hypothetical proteins were also assigned.

Both strains carried *aac(6')-Iaa* (aminoglycoside resistance determinant). Detailed information on the occurrence of virulence factors for the two biovars is shown in Table 2. Additionally, the *S. Pullorum* ST92 strain harbored plasmid IncFII(S) (CP000858). No plasmid was identified in *S. Gallinarum* ST78 genome.

Phylogenetic analysis of the experimental *S. Pullorum* ST92 and *S. Gallinarum* ST78 strains and further 49 genomes are shown in Figure 2. The *S. Pullorum* ST92 isolate was classified into the taxonomic group of *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* circulating in Brazil and the USA with only minor evolutionary divergences. *S. Gallinarum* ST78 isolate was grouped in a clade with a set of lineages belonging only to the biovar *Gallinarum* isolated mostly in Brazil and Tanzania. Interestingly, the *S. Gallinarum* ST78 isolate was shown to be the basal lineage of the 287/91 strain (NC_011274.1) associated with avian typhoid salmonellosis outbreaks in Brazil in the 1990s (Thomson *et al.*, 2008) (Table S1). Both

taxonomic groups shown in the phylogenetic tree suggest the circulation of these *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* biovars in Brazil and their association with outbreaks of Typhoid Fever and Pullorosis in the country (Langridge *et al.*, 2015; De Carli *et al.*, 2017). Additionally, the high similarity within the strains of this biovar suggest the presence of little molecular variation. These results are well supported by bootstrap values.

The pathogenicity mechanism of *Salmonella* spp. includes a wide range of virulence factors encoded by virulence genes carried through genetic elements (prophage, plasmids, and pathogenicity islands), linked to processes of invasion, colonization, survival, and intracellular replication in host cells has been extensively studied (Suzuki, 1994; Rychlik *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Vaid *et al.*, 2021). However, few reports are available about the occurrence of virulence genes in *S. Pullorum* and *S. Gallinarum* biovars.

We identified the presence of the five major pathogenic islands: SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, and SPI-5 (Figure 3). We identified 23 important virulence genes: *invA*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *sptP*, *hilC*, *hilA*, *hilD*, *orgA*, *sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sipB*, *sopB*, *lpfC*, *spvB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc* in the genome of the *S. Pullorum* ST92 strain. Only 10 of them (*sifA*, *mgtB*, *mgtC*, *misL*, *sopB*, *pipB*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc*) were detected in *S. Gallinarum* ST78 isolate. The virulence genes reported here are in accordance to previous studies (Zhang *et al.*, 2018). Among the virulence genes, 11 genes (*invA*, *spaO*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*, *sptP*, *hilC*, *hilA*, *hilD*, *orgA* and *sipB*) were related to SPI-1, the genes (*sifA*, *ssa*, *ssr*, *sse*, and *ssc*) are related to SPI-2, the genes (*mgtB*, *mgtC*, *misL*) are related to SPI-3, and the genes (*sopB*, *pipB*) are associated with SPI-5, while the *lpfC* and *spvB* genes are integrated into the chromosomal DNA and plasmid, respectively (Zhang *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2019).

SPI-1 and SPI-2 are the most frequently studied in *Salmonella enterica* (Lawley *et al.*, 2006; Lou *et al.*, 2019). *Salmonella* employs two type III secretion systems (TTSS-1 and TTSS-2), encoded by pathogenicity islands (SPI-1 and SPI-2), respectively (Lou *et al.*, 2019). Virulence genes related to TTSS-1, considered the most important virulence factor of *Salmonella* and encoded by SPI-1, known as a conserved and complex regulatory network, are associated with adherence processes, intracellular invasion and regulation of the immune response of the organism host (Hensel *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2019).

Pathogenicity islands SPI-2, SPI-3, and SPI-4 carry virulence genes associated with controlling *Salmonella* replication and survival in host cells (Cirillo *et al.*, 1998; Hensel *et al.*, 1998; Waterman & Holden, 2003; Zhang *et al.*, 2018; Lou *et al.*, 2019), while SPI-5 has been reported to encode effector proteins translocated by TTSSs associated with SPI-1 and SPI-2 (Schmidt & Hensel, 2004; Lou *et al.*, 2019).

Plasmids are important for *Salmonella enterica* virulence, with reduced virulence being observed in their absence (Karasova *et al.*, 2009). Our results showed that the *spvB* gene associated with the mechanism of cytoskeleton stabilization during the pathogenesis process (Skyberg *et al.*, 2006; Rodicio *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018), was present only in the *S. Pullorum* strain, suggesting that the absence of this *spvB* gene may be associated with the absence of plasmids of virulence can result in both a reduction in virulence and a loss, which consequently can alter their ability to infect host cells (Suzuki, 1994; Rodicio *et al.*, 2011).

4. CONCLUSION

The genome sequences of *S. enterica* serovar Gallinarum biovar *S. Gallinarum* ST78 and *S. Pullorum* ST92 will considering that these results may help in the better

characterization of these two biovars, as well as in future investigations about these virulence factors identified in the genome of these two bacteria. Furthermore, the genomic characteristics identified here provide information on the evolution of *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* biovars and demonstrate the importance and efficiency of using whole genome sequencing in future studies of epidemiological investigations associated with outbreaks of these diseases related to these diseases two biovars.

Data availability

The draft genome sequences of these two strains are available in GenBank under accession numbers: BioSample (SAMN25652641) for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum 4295/02 (ST78) and BioSample (SAMN25643764) for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum 20811/12 (ST92) strains, respectively.

Acknowledgement

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/proc. 55191/2007-0; Brasília-DF, Brazil) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES, financing code 001) for financial support.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Additional information

Funding

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/proc. 55191/2007-0; Brasília-DF, Brazil) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES, financing code 001). The funders had no role in the design of this study, its data collection and interpretation, nor the decision to submit the work for publication.

References

1. Alikhan, N.F., Petty, N.K., Ben Zakour, N.L. & Beatson, S.A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, 12, 1-10.
2. Barrow, P.A. & Freitas Neto, O.C. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid--new thoughts on old diseases: a review. *Avian Pathology*, 40, 1–13.
3. Bolger, A.M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114–2120.
4. Capita, R., Alonso-Calleja, C. & Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1366–1375.
5. Cirillo, D.M., Valdivia, R.H., Monack, D.M. & Falkow, S. (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Molecular Microbiology*, 30, 175–188.
6. Crichton, P.B. & Old, D.C. (1990) *Salmonella* of serotypes Gallinarum and Pullorum grouped by biotyping and fimbrial-gene probing. *Journal of Medical Microbiology*, 32, 145–152.
7. Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 1.
8. De Carli, S., Gräf, T., Kipper, D., Lehmann, F.K.M., Zanetti, N., Siqueira, F.M., Cibulski, S., Fonseca, A.S.K., Ikuta, N. & Lunge, V.R. (2017). Molecular and phylogenetic analyses of *Salmonella* Gallinarum trace the origin and diversification of recent outbreaks of fowl typhoid in poultry farms. *Veterinary*

- Microbiology*, 212, 80–86.
9. Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17, 368–376.
 10. Foley, S.L., Johnson, T.J., Ricke, S.C., Nayak, R. & Danzeisen, J. (2013). *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 582–607.
 11. Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F. & Rhen, M. (1993). Molecular analysis of spv virulence genes of the *salmonella* virulence plasmids. *Molecular Microbiology*, 7, 825–830.
 - Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., Vazquez-Torres, A., Gleeson, C., Fang, F.C. & Holden, D.W. (1998). Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Molecular Microbiology*, 30, 163–174.
 12. Jones, M.A., Wigley, P., Page, K.L., Hulme, S.D. & Barrow, P.A. (2001). *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 Type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 Type III secretion system for virulence in chickens. *Infection and Immunity*, 69, 5471–5476.
 13. Kaas, R.S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F.M. & Lund, O. (2014). Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE*, 9, 1-8.
 14. Kang, M-S., Kwon, Y-K., Jung, B-Y., Kim, A., Lee, K-M., An, B-K., Song, E-A., Kwon, J-H. & Chung, G-S. (2011). Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of glgC and speC genes. *Veterinary Microbiology*, 147, 181–185.
 15. Karasova, D., Havlickova, H., Sisak, F. & Rychlik, I. (2009). Deletion of sodCI and spvBC in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reduced its virulence to the natural virulence of serovars Agona, Hadar and Infantis for mice but not for chickens early after infection. *Veterinary Microbiology*, 139, 304–309.
 16. Langridge, G.C., Fookes, M., Connor, T.R., Feltwell, T., Feasey, N., Parsons, B.N., Seth-Smith, H.M.B., Barquist, L., Stedman, A., Humphrey, T., Wigley, P., Peters, S.E., Maskell, D.J., Corander, J., Chabalgoity, J.A., Barrow, P., Parkhill,

- J., Dougan, G. & Thomson, N.R. (2015). Patterns of genome evolution that have accompanied host adaptation in *Salmonella*. *Proceedings of National Academy Sciences*, 112, 863–868.
17. Lawley, T.D., Chan, K., Thompson, L.J., Kim, C.C., Govoni, G.R. & Monack, D.M. (2006). Genome-Wide Screen for *Salmonella* Genes Required for Long-Term Systemic Infection of the Mouse. *PLoS Pathogens*, 2, 1-14.
 18. Liu, G.R., Rahn, A., Liu, W-Q., Sanderson, K.E., Johnston, R.N. & Liu, S-L. (2002). The evolving genome of *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Journal of Bacteriology*, 184, 2626–2633.
 19. Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L. & Yang, J. (2022). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 50, D912–917.
 20. Lou, L., Zhang, P., Piao, R. & Wang, Y. (2019). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 1-12.
 21. Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G. & Finlay, B.B. (2000). *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection*, 2, 145–156.
 22. Rychlik, I., Karasova, D., Sebkova, A., Volf, J., Sisak, F., Havlickova, H., Kummer, V., Imre, A., Szmolka, A. & Nagy, B. (2009). Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiology*, 9, 1-9.
 23. Rodicio, M.R., Herrero, A., Rodríguez, I., García, P., Montero, I., Beutlich, J., Rodicio, R., Guerra, B., & Mendoza, M.C. (2011). Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. *Reviews in Medical Microbiology*, 22, 55–65.
 24. Schmidt, H. & Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 14–56.
 25. Shivaprasad, H.L. (2000). Fowl typhoid and pullorum disease. *Revue Scientifique et Technique*, 19, 405–424.
 26. Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R. & Saxena, M.K. (2018). Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. In: Mascellino MT, editor. *Salmonella - A Re-emerging Pathogen*.
 27. Skyberg, J.A., Logue, C.M. & Nolan, L.K. (2006). Virulence Genotyping of

- Salmonella* spp. with Multiplex PCR. *Avian Diseases*, 50, 77–81.
28. Sun, F., Li, X., Wang, Y., Wang, F., Ge, H., Pan, Z., Xu, Y., Wang, Y., Jiao, X. & Chen, X. (2021). Epidemic patterns of antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum isolates in China during the past half-century. *Poultry Science*, 100, 1-7.
 29. Suzuki, S. (1994). Pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 89–105.
 30. Sylejmani, D., Musliu, A., Ramadani, N., Sparagano, O. & Hamidi, A. (2016). Associations Between the Level of Biosecurity and Occurrence of *Dermatophytes* in Layer Farms. *Avian Diseases*, 60, 454–459.
 31. Thomson, N.R., Clayton, D.J., Windhorst, D., Vernikos, G., Davidson, S., Churcher, C., Quail, M.A., Stevens, M., Jones, M.A., Watson, M., Barron, A., Layton, A., Pickard D., Kingsley, R.A., Bignell, A., Clark, L., Harris, B., Ormond, D., Abdellah, Z., Brooks, K., Cherevach, I., Chillingworth, T., Woodward, J., Norberczak, H., Lord, A., Arrowsmith, C., Jagels, K., Moule, S., Mungal, K., Sanders, M., Whitehead, S., Chabalgoity, J.A., Maskell, D., Humphrey, T., Roberts, M., Barrow, P.A., Dougan, G. & Parkhill, J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Research*, 18, 1624–1637.
 32. Vaid, R.K., Thakur, Z., Anand, T., Kumar, S. & Tripathi BN (2021). Comparative genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum decodes strain specific genes. *PLoS ONE*, 16, 1-29.
 33. Wang, X., Wang, H., Li, T., Liu, F., Cheng, Y., Guo, X., Wen, G., Luo, Q., Shao, H., Pan, Z. & Zhang, T. (2020). Characterization of *Salmonella* spp. isolated from chickens in Central China. *BMC Veterinary Research*, 16, 1-9.
 34. Waterman, S.R. & Holden, D.W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cellular Microbiology*, 5, 501–511.
 35. Wattam, A.R., Davis, J.J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., Conrad, N., Dietrich, E.M., Disz, T., Gabbard, J.L., Gerdes, S., Henry, C.S., Kenyon, R.W., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E.K., Olsen, G.J., Murphy-Olson, D.E., Olson, R., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G.D., Shukla, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Yoo, H. & Stevens, R.L. (2017). Improvements to PATRIC, the all-

- bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Research*, 45, D535–542.
36. Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L. & Holt, K.E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13, 1-22.
37. Wu, K-Y., Liu, G-R., Liu, W-Q., Wang, A.Q., Zhan, S., Sanderson, K.E., Johnston, R.N. & Liu, S-L. (2005). The genome of *Salmonella enterica* serovar gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. *Journal of Bacteriology*, 187, 4720–4727.
38. Zhang, D., Zhuang, L., Wang, C., Zhang, P., Zhang, T., Shao, H., Han, X. & Gong, J. (2018). Virulence Gene Distribution of *Salmonella* Pullorum Isolates Recovered from Chickens in China (1953–2015). *Avian Diseases*, 62, 431-436.

Figure legend:

Figure 1: Circular representation of the *S. Gallinarum* ST78 and *S. Pullorum* ST92.

Analysis of annotated genome via online-based bioinformatics tool, PATRIC, produced circular genome map. (a) shows *S. Gallinarum* ST78 and (b) *S. Pullorum* ST92. From the outer to the inner ring - contigs (scale - x1Mbp), CDS in the direct strand, CDS in the reverse strand, RNA genes, CDS with homology to known antimicrobial resistance genes, CDS with homology to known virulence factors, GC content and GC skew.

Figure 2: BRIG output image of the *S. Gallinarum* ST78 and *S. Pullorum* ST92.

The black circle represents the genome sequence of *S. Gallinarum* ST78 strain, and the gray circle indicates the genome sequence of *S. Pullorum* ST92. In green and purple the slope of the GC content. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 was used as the reference genome. On the red arrow are the positions of the *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI-1, SPI-3, and SPI-5) on the blue arrow are the positions of SPI-2 and SPI-4.

Figure 3: Phylogenetic two of the strains analyzed in this study.

Phylogenetic tree of *S. Gallinarum* strain 4295/02 (ST78) (Filled circle) and *S. Pullorum* 20811/12 (ST92) (Filled triangle) strains based on the complete genome sequence, representing the phylogenetic position of the new sequenced strains with respect to other strains of these biovars and available in public databases. The genome of the bacterium *Shigella flexneri* 1235-66 was used as an outgroup. Tree generated using MEGA6 version 11 under maximum likelihood (ML) criteria. The numbers on the nodes indicate the percentage of

bootstrap support based on 1000 pseudo-bootstrap replicas that support the cluster.

Bootstrap values below 50% were not shown. The scale bar indicates 0.05 changes.

Table 1: Comparison of the genome's assembly and annotation of *Salmonella* Gallinarum ST78 and *Salmonella* Pullorum ST92.

Strains	Type	Name	Number of contigs	N50 (bp)	Size (bp)	CDS	CG%	tRNA	rRNA	Accession no.
S. Gallinarum	Chr	I	36	366,906	4,456,744	4,567	52.23	62	4	SAMN25652641
	Plsm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. Pullorum	Chr	I	34	405,031	4,739,458	4,876	52.17	67	3	SAMN25643764
	Plsm	IncFII(S)	3	86,771	93,450	-	53.1	-	-	CP000858

Legend: (Chr) Chromosome

(Plsm) Plasmid

(-) This isolate does not harbor a virulence plasmid.

Table 2: Antimicrobial resistance genes annotated by CARD and virulence factors by VFDB in *S. Gallinarum* 4295/02 and *S. Pullorum* 20811/12 strains respectively isolated from laying hens and broiler chickens in Brazil.

Features	<i>S. Gallinarum</i>	<i>S. Pullorum</i>
Resistome¹	<i>aac(6')-Iaa</i> (Aminoglycoside)	<i>aac(6')-Iaa</i> (Aminoglycoside)
MLST (ST)²	78	92
Virulence factors (VFDB)³		
Fimbrial Adherence determinants		
	<i>csgA, csgB, csgC, csgD,</i> <i>csgE, csgF, csgG, bcfA,</i> <i>bcfB, bcfC, bcfD, bcfE,</i> <i>bcfF, bcfG, fimA, fimC,</i> <i>fimD, fimF, fimH, fimI,</i> <i>fimW, fimY, fimZ, lpfA,</i> <i>lpfB, lpfC, lpfD, lpfE,</i> <i>pegA, pegB, pegC, pegD,</i> <i>safB, safD, sefC, stbA,</i> <i>stbB, stbC, stbD, stbE,</i> <i>steA, steB, steC, steD, steE,</i> <i>steF, stfA, stfC, stfD, stfE,</i> <i>stfF, stfG, sthA, sthC, sthD,</i> <i>sthE, stiA, stiB, stiC, stiH,</i>	<i>csgA, csgB, csgC, csgD,</i> <i>csgE, csgF, csgG, bcfA,</i> <i>bcfB, bcfC, bcfD, bcfE,</i> <i>bcfF, bcfG, fimA, fimC,</i> <i>fimD, fimF, fimH, fimI,</i> <i>fimY, fimZ, lpfA, lpfB,</i> <i>lpfC, lpfD, lpfE, pegA,</i> <i>pegB, pegC, pegD, safB,</i> <i>safC, safD, stbA, stbB,</i> <i>stbC, stbD, stbE, stdA,</i> <i>stdB, stdC, steA, steC,</i> <i>steD, steE, steF, stfA,</i> <i>stfC, stfD, stfE, stfF,</i>

		<i>stfG, sthA, sthC, sthD,</i> <i>sthE, stiA, stiB, stiC, stiH</i>
Macrophage inducible genes	<i>mig-14</i>	<i>mig-14, mig-5</i>
Magnesium uptake	<i>mgtB, mgtC</i>	<i>mgtB, mgtC</i>
Nonfimbrial adherence determinants	<i>misL, shdA, sinH</i>	<i>misL, ratB, shdA, sinH</i>
Regulation	<i>phoP, phoQ</i>	<i>phoP, phoQ</i>
Secretion system	<i>ssaC, ssaD, ssaE, ssaG,</i> <i>ssaH, ssaI, ssaJ, ssaK,</i> <i>ssaL, ssaM, ssaN, ssaO,</i> <i>ssaP, ssaQ, ssaR, ssaT,</i> <i>ssaU, ssaV, sscA, sscB,</i> <i>sseB, sseC, sseD, sseE,</i> <i>ssrA, ssrB, slrP, sopA,</i> <i>sopB/sigD, sopD, sopE2,</i> <i>pipB, sifA, sifB, sseF, sseG,</i> <i>sseJ, sseK1, sspH2, aec15,</i> <i>aec16, aec17, aec18,</i> <i>aec19, aec22, aec23,</i> <i>aec24, aec25, aec26,</i> <i>aec27/clpV, aec28, aec29,</i> <i>aec30, aec31, aec32</i>	<i>hilA, hilC, hilD, iacP,</i> <i>iagB, invA, invB, invC,</i> <i>invE, invF, invG, invH,</i> <i>invI, invJ, orgA, orgB,</i> <i>orgC, prgH, prgI, prgJ,</i> <i>prgK, sicA, sicP, sipD,</i> <i>spaO, spaP, spaQ, spaR,</i> <i>spaS, sprB, ssaC, ssaD,</i> <i>ssaE, ssaG, ssaH, ssaI,</i> <i>ssaJ, ssaK, ssaL, ssaM,</i> <i>ssaN, ssaO, ssaP, ssaQ,</i> <i>ssaR, ssaT, ssaU, ssaV,</i> <i>sscA, sscB, sseB, sseC,</i> <i>sseD, sseE, ssrA, ssrB,</i> <i>slrP, avrA, sipA, sipB,</i> <i>sipC, sopA, sopB/sigD,</i> <i>sopD, sopE2, sptP,</i> <i>pipB2, pipB, sifA, sifB,</i> <i>sseF, ssrG, sseJ, sseK1,</i>

sseL, *sspH2*, *aec15*,
aec16, *aec17*, *aec18*,
aec19, *aec22*, *aec23*,
aec24, *aec25*, *aec26*,
aec27/clpV, *aec28*,
aec29, *aec30*, *aec31*,
aec32

Stress adaptation	<i>sodCI</i>	<i>sodCI</i>
Toxin	-	<i>spvB</i>
Adherence	-	<i>faeH</i> , <i>faeI</i> , <i>faeJ</i>
Autotransporter	<i>ehaB</i>	<i>ehaB</i>

¹<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi;>

²[https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/;](https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/)

³<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi?func=VFanalyzer>.

Figure 1:

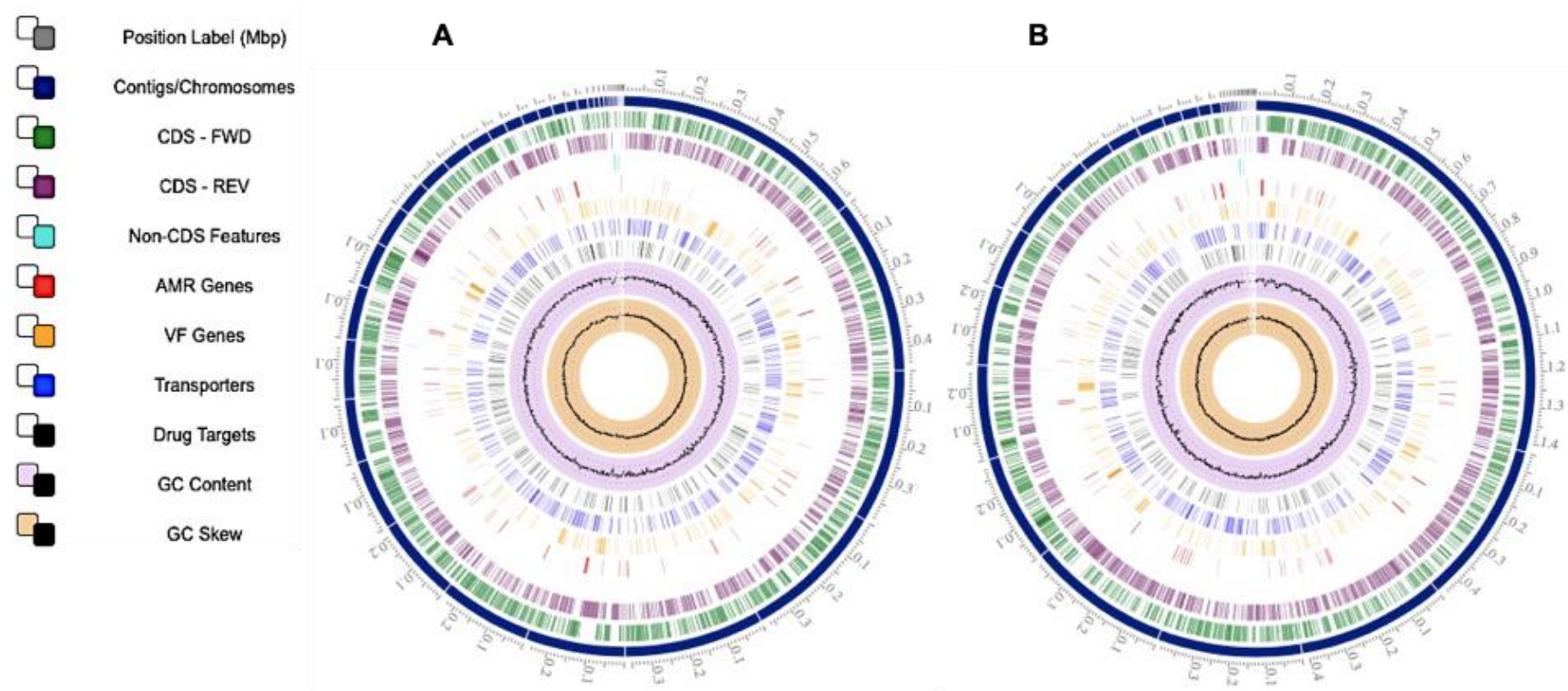


Figure 2:

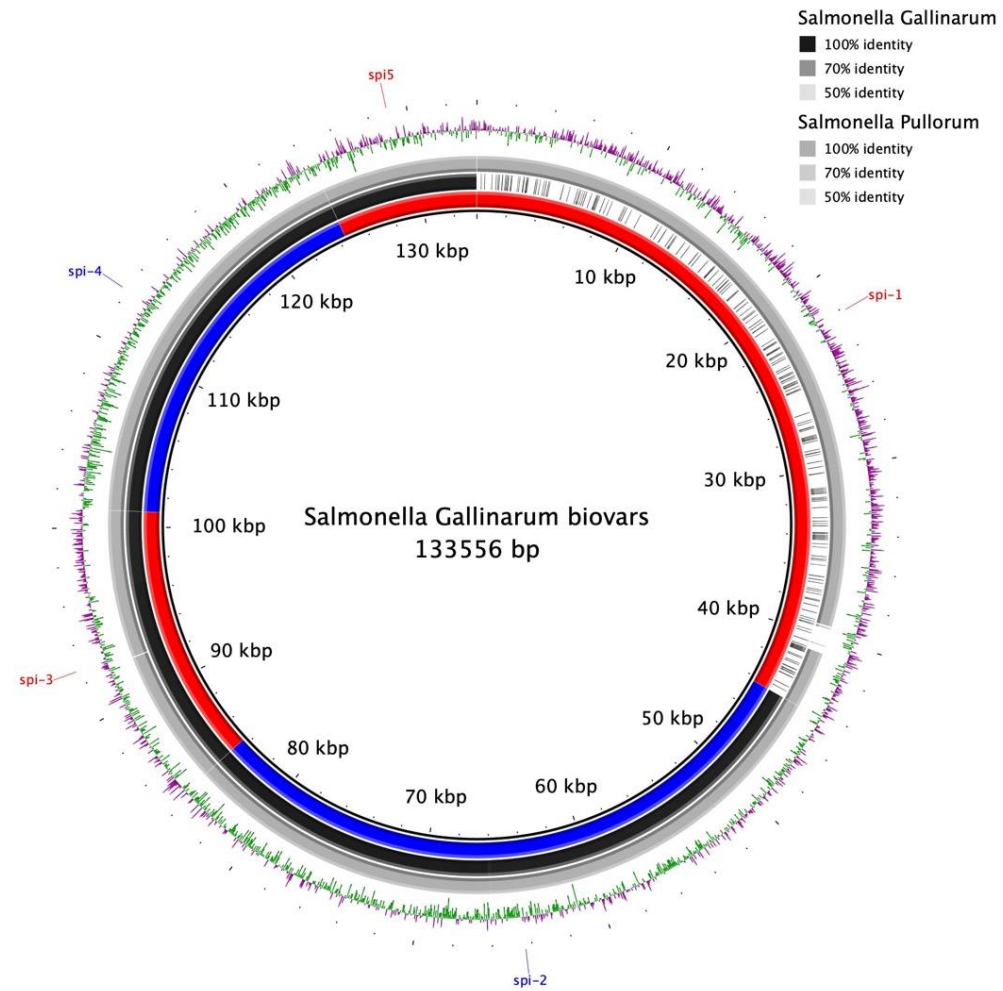
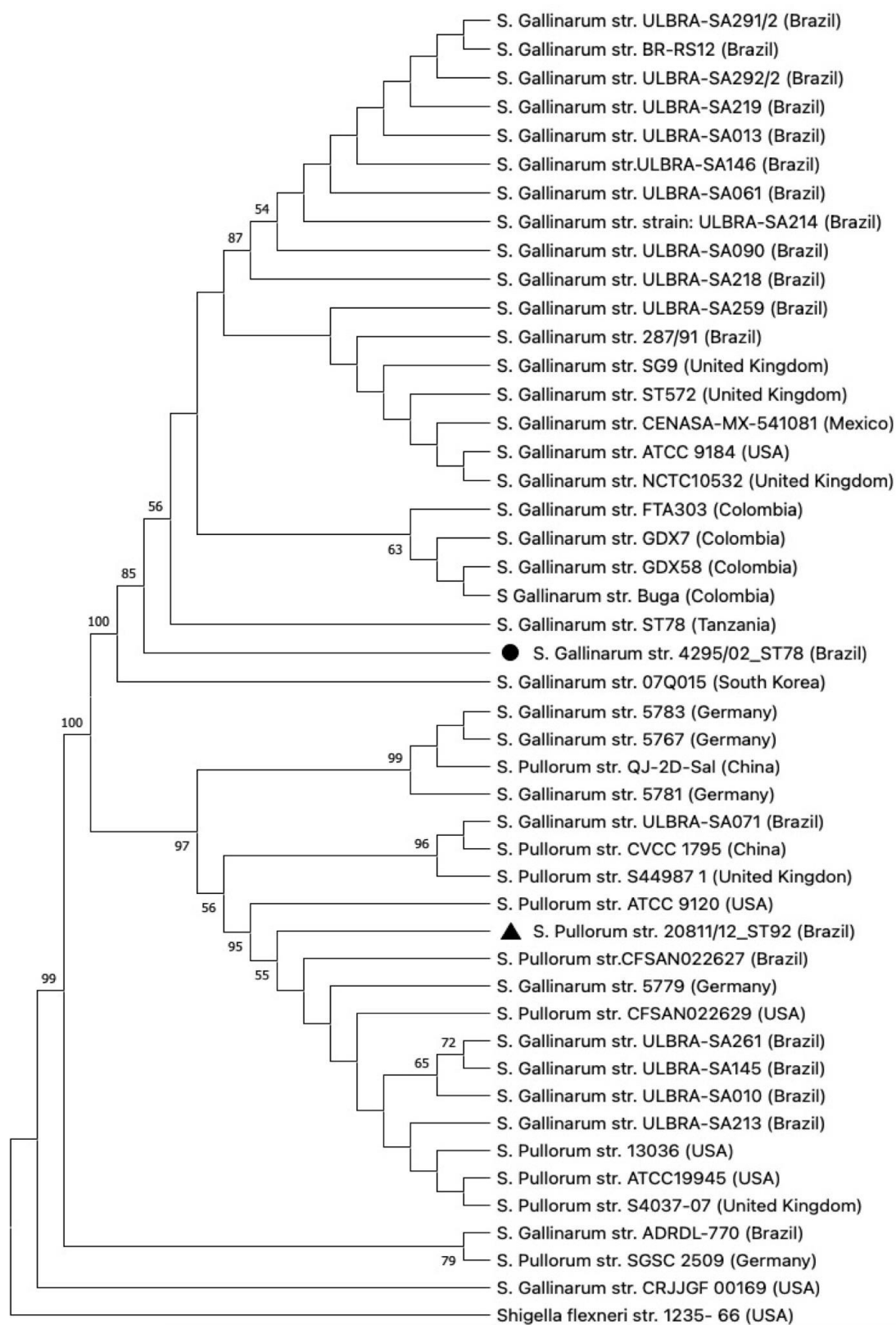


Figure 3:



Supplementary data

Table S1: Complementary data on the biovars *S. Gallinarum* 4295/02 (ST78) and *S. Pullorum* 20811/12 (ST92) isolated in Brazil.

ID	Strain	Location	Laboratory	Year	Isolated	Information
4295/02	(<i>Salmonella</i> <i>Gallinarum</i> ST78)	MG	Fiocruz	2002	Layer chicken	Related to the (<i>S.</i> <i>Gallinarum</i> 287/91 strain; Chicken showing clinical signs; (Endemic clone in Brazil- outbreak resurgence).
20811/12	(<i>Salmonella</i> <i>Pullorum</i> ST92)	RS	Mercolab	2012	Broiler	Broiler showing clinical signs (sporadic case).

**Note: Both strains were isolated in Brazil;*

MG - Minas Gerais;

RS – Rio Grande do Sul.

Table S2: Genomes belonging to the Gallinarum ST78 and Pullorum ST92 biovars used for the construction of the phylogenetic tree with their respective access numbers to public databases. Access: NCBI FTP server (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov>) and (<http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/senterica>).

Strain	Level	Serovar	Source	Year	Location	Acession number
S. Gallinarum, (strain: CRJJGF_00169)	Scaffold	Gallinarum	Poultry	2004	USA	SRR1686643
S. Gallinarum, (strain: ADRDL-770)	Contig	Gallinarum	Poultry	2011	Brazil	SRR5155664
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA010)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	SRR7284658
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA214)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Brazil	SRR7628929
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA219)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Brazil	SRR8177075
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA218)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Brazil	SRR8177071
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA213)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Brazil	SRR8177054
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA013)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	SRR8177043
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA145)	Contig	Gallinarum	Poultry	2015	Brazil	SRR8177031
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA071)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	SRR8177023

S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA261)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Brazil	SRR8177018
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA146)	Contig	Gallinarum	Poultry	2015	Brazil	SRR8177016
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA061)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	SRR8177011
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA292/2)	Contig	Gallinarum	Poultry	2018	Brazil	SRR8544154
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA090)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	SRR6927292
S. Gallinarum (ST78)	Contig	Gallinarum	Poultry	2017	Tanzania	SRR11005774
S. Gallinarum (strain: 287/91)	Complete	Gallinarum	Gallus gallus	2008	Brazil	AM933173.1
S. Gallinarum, (strain:07Q015)	Complete	Gallinarum	Chicken	2007	South Korea	CP077760.1
S. Gallinarum, (strain: ATCC9184)	Complete	Gallinarum	Culture collection	2013	USA	CP019035.1
S. Gallinarum, (strain: SG9)	Chromosome	Gallinarum	Chicken	1995	United Kingdom	AEUL00000000.1
S. Gallinarum, (ST572)	Contig	Gallinarum	-	2009	United Kingdom	LHST00000000.1
S. Gallinarum, (strain: 5767)	Scaffold	Gallinarum	Gallus gallus	2013	Germany	PRJNA626643
S. Gallinarum, (strain:5783)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2013	Germany	JABBF000000000.1
S. Gallinarum, (strain:5781)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2013	Germany	JABBG000000000.1
S. Gallinarum, (strain: GDX58)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2017	Colombia	QYTX00000000.1
S. Gallinarum, (strain:5779)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2013	Germany	JABBK000000000.1
S. Gallinarum, (strain:GDX7)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2017	Colombia	QYTY00000000.1
S. Gallinarum, (strain: Buga)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2017	Colombia	RHEL00000000.1
S. Gallinarum, (strain: NCTC10532)	Contig	Gallinarum	Culture collection	2017	United Kingdom	MWLV00000000.1

S. Gallinarum, (Strain:BR_RS12)	Contig	Gallinarum	Poultry	2014	Brazil	LNON00000000.1
S. Gallinarum, (Strain: FTA303)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2017	Colombia	QZND00000000.1
S. Gallinarum, (Strain: CENASA-MX-541081)	Scaffold	Gallinarum	Gallus gallus	2020	Mexico	JACYOU000000000.1
S. Pullorum, (strain: CFSAN022629)	Contig	Pullorum	Chicken	2014	USA	SRR2016690
S. Pullorum, (strain: CFSAN022627)	Complete	Pullorum	Chicken	2014	Brazil	SRR11318035
S. Pullorum, (strain: SGSC 2509)	Contig	Pullorum	Food	2018	Germany	SRR9185088
S. Pullorum, (strain: S4037-07)	Contig	Pullorum	Perdicinae (Birds)	2007	United Kingdom	LHTF00000000.1
S. Pullorum, (strain: CVCC 1795)	Scaffold	Pullorum	Chicken	2020	China	JAIPUH000000000
S. Pullorum, (strain:13036)	Contig	Pullorum	Derived-species	2013	USA	AYDA000000000
S. Pullorum, (strain: ATCC19945)	Contig	Pullorum	Culture collection	2013	USA	AOYI000000000
S. Pullorum, (strain: S44987_1)	Scaffold	Pullorum	Chromosome	2014	United Kingdom	LK931482.1
S. Pullorum, (strain:NCTC10705)	Contig	Pullorum	Fowl	1970	<u>United Kingdom</u>	ERS685301
S. Pullorum, (strain: QJ-2D-Sal)	Complete	Pullorum	Chicken tissue	2017	China	CP022964
S. Pullorum, (strain: ATCC 9120)	Complete	Pullorum	Human diarrhea patient	2016	USA	CP012347

S. Gallinarum, (strain: UBRA-SA291/2)	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2018	Brazil	AAFNYN000000000.1
S. Gallinarum, Brazil, (strain: 4295/02 (ST78))	Contig	Gallinarum	Birds	2002	Brazil	SAMN25652641
S. Gallinarum, (strain: ULBRA-SA259	Contig	Gallinarum	Gallus gallus	2017	Brazil	SRR8177052
S. Gallinarum (ST78)	Contig	Gallinarum	Chicken	2017	Tanzania	SRR11005774
S. Pullorum, (strain: 20811/12 (ST92))	Contig	Pullorum	Birds	2012	Brazil	SAMN25643764
<i>Shigella flexneri</i> , (strain: 1235-66)	Contig	-	Stool	2012	USA	AKNF00000000

Last accessed on November 28, 2021.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise desses genomas permitiu uma melhor caracterização desses dois biovars (*Salmonella* Gallinarum ST78 e *Salmonella* Pullorum ST92), assim como, a identificação de genes de virulência compartilhados ou ausentes entre as cepas sugerindo que a perda genética identificada no genoma de *Salmonella* Gallinarum pode estar refletindo a sua adaptação ao ambiente em mudança. Ainda, em vista do fato de que a vigilância epidemiológica eficiente busca elucidar não apenas a origem das cepas de diferentes localidades no mundo, mas também busca entender suas relações filogenéticas, nossos dados apresentaram novos aspectos evolutivos acerca desses isolados sugerindo que há a circulação desses biovars há décadas no Brasil associados a surtos esporádicos de salmoneloses aviárias e febre tifoide. Diante disso, nossos resultados demonstram a importância do uso das ferramentas de bioinformática não apenas para estudos de genômica comparativa, mas para futuros estudos epidemiológicos relacionados as doenças Pulorose e Tifo aviário no setor avícola no Brasil.