

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENOMAS DE *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* SOROVAR Gallinarum BIOVARES
Gallinarum 287/91 E Pullorum 449/87 PARA
IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE DIFERENÇAS (RODS)**

Diego Felipe Alves Batista

Médico Veterinário

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENOMAS DE *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* SOROVAR Gallinarum BIOVARES
Gallinarum 287/91 E Pullorum 449/87 PARA
IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE DIFERENÇAS (RODS)**

Diego Felipe Alves Batista

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

Dissertação de Mestrado apresentada a
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
– Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária

2013

B333a 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) / Diego Felipe Alves Batista. -- Jaboticabal, 2013
xii, 77 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Angelo Berchieri Junior
Coorientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto
Banca examinadora: Manoel Victor Franco Lemos, Marcelo Brocchi
Bibliografia

1. Comparação de Genomas. 2. Tifo Aviário. 3. Pulorose. 4. Patogenicidade. 5. *Salmonella*. 6. PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENOMAS DE *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR Gallinarum BIOVARES Gallinarum 287/91 E Pullorum 449/87 PARA IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE DIFERENÇAS (RODS)

AUTOR: DIEGO FELIPE ALVES BATISTA

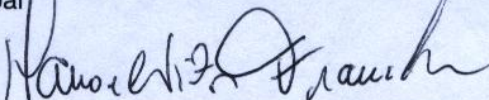
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

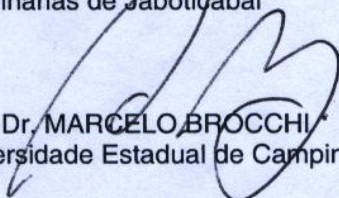

Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MANOEL VICTOR FRANCO LEMOS

Departamento de Biologia Aplicada À Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MARCELO BROCCHI

Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP

Data da realização: 23 de julho de 2013.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Diego Felipe Alves Batista, nascido no Rio de Janeiro em 16 de julho de 1986, ingressou na Faculdade de Medicina Veterinária no ano de 2005 e obteve o bacharel pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV-UFU) em julho de 2010. Durante esse período participou de projetos nas áreas de suinocultura e bovinocultura de leite e foi bolsista de iniciação científica entre 2008-2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Agradeço aos amigos Ketherson Rodrigues Silva, Adriana Maria de Almeida, Priscila Diniz Lopes, Filipe Fernando e os outros vários que eu tive a oportunidade de conhecer durante o mestrado. Suas companhias tornaram esses dois anos mais divertidos e produtivos.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e ao meu coorientador, Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto, pela oportunidade de realizar esse trabalho e apoio científico nos momentos de dificuldade.

Agradeço a CAPES, FAPESP, CNPq e ao programa de Microbiologia Agropecuária pelo suporte financeiro concedido para a realização desse projeto e publicação dos artigos científicos dele originados.

Um muito obrigado ao Dr. Guilherme de Oliveira, Msc. Laura Rabelo Leite e a toda a equipe do Centro de Excelência em Bioinformática (Cebio) da Fiocruz de Belo Horizonte/MG pelo suporte fornecido na análise dos genomas. Sem eles muito do que foi feito não teria passado de ideias.

Um agradecimento especial para Marleide (mãe), Geraldo (pai), Ana (irmã) e Bruno (irmão), que sempre acreditaram e torceram pelo meu sucesso.

Por fim, agradeço à Márcia Marisa Gomes Jusi, uma pessoa especial que conheci nesse período e que me acompanhou em todos os momentos dessa caminhada.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	vii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Aspectos gerais do gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2. Salmoneloses Aviárias – Tifo aviário e pulrose	6
2.3. O genoma de <i>Salmonella</i>	9
2.4. Genômica de <i>Salmonella</i> Gallinarum e <i>Salmonella</i> Pullorum	13
3. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivos Gerais.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. Origem e análise dos genomas.....	19
4.2. Construção dos iniciadores	19
4.3. Origem dos micro-organismos	21
4.4. Cultivo e armazenamento das amostras	23
4.5. Testes Bioquímicos	24
4.6. Sorologia	24
4.7. Extração de DNA	25
4.8. Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	26
4.9. Análise da conservação das RODs nos isolados de <i>S. Gallinarum</i> e <i>S. Pullorum</i>	27
4.10. Purificação de produtos da PCR	28
4.11. Sequenciamento das amostras	29
4.12. Análise de Agrupamento Hierárquico do padrão de bandas da PCR	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Confirmação microbiológica das estirpes analisadas.....	30
5.2. Análises comparativas entre <i>S. Gallinarum</i> e <i>S. Pullorum</i>	31

5.3. Análise das RODs por PCR e agrupamento das estirpes	36
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	53
Apêndice A: Dados completos de todas as RODs identificadas (Tabela 1A) e das ilhas de patogenicidades/"operons" fimbriais (Tabela 2A) localizados nos genomas de <i>S. Gallinarum</i> e <i>S. Pullorum</i>	67
Apêndice B: Imagens das RODs que foram analisadas por PCR em todas as estirpes	72

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Nome e sequência dos iniciadores e o tamanho esperado dos fragmentos nas estirpes padrão.	20
Tabela 2. Informações sobre as estirpes de <i>S. Gallinarum</i> e de <i>S. Pullorum</i> utilizadas nesse estudo.	22
Tabela 3. Concentração dos reagentes de PCR usados neste estudo.	27
Tabela 4. Parâmetros utilizados na PCR.	27
Tabela 5. Comportamento bioquímico e sorológico das estirpes analisadas.	30
Tabela 6. “Pseudogenes” compartilhados entre SG287/91 e SP449/87 e/ou SP RKS5078.	35
Tabela 7. RODs verificadas por PCR e sua conservação nas estirpes utilizadas.	40
 Figura 1. Demonstração da ROD6 no programa ACT (seta preta). ROD não conservada formada por deleção dos ortólogos de <i>fimA</i> e <i>fimI</i> somente no genoma de SP449/87. A ausência de conservação nessa ROD foi comprovada por PCR (Figura B5).	32
Figura 2. Demonstração da ROD37 no programa ACT (setas pretas). ROD formada por deleção dos ortólogos de <i>torR</i> e <i>torC</i> em SP449/87 e SP RKS5078. Os genes <i>torT</i> e <i>torA</i> são remanescentes nos genomas de <i>S. Pullorum</i> . Essa ROD foi conservada tanto à comparação dos genomas quanto por PCR (Figura B31).	32
Figura 3. Distribuição de <i>loci</i> afetados contidos nas RODs identificadas entre SG287/91, SP449/87 e RKS5078. (A) O diagrama de Venn mostra o número de “pseudogenes” único ou compartilhado entre elas; (B) distribuição de <i>loci</i> com polimorfismos de tamanho (sem putativa perda de função); (C) quantidade de ortólogos que não foram identificados em um ou mais genomas.	33
Figura 4. Dendrograma agrupando as estirpes de <i>S. Gallinarum</i> e <i>S. Pullorum</i> com base no perfil de bandas em cada ROD. Quadrados fechados destacam as estirpes 26 e 33 do biovar <i>Gallinarum</i> com perfis únicos e quadrados pontilhados as estirpes-padrão.	37
Figura 5. Eletroforograma em agarose 1,5% da ROD8 (gene <i>tolA</i>). Gene possivelmente alvo de formação de “pseudogene”. M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Fermentas, US). G+: Controle positivo de <i>S. Gallinarum</i> (SG287/91). P+: Controle positivo <i>S. Pullorum</i> (SP449/87). CN: Controle negativo. Números arábicos: estirpes testadas. Setas brancas: “amplicons” com tamanho molecular fora do esperado.	38

Figura 6. Eletroforograma em agarose 1,5% da ROD33 (homologia com o gene *rcnA*). Região de formação de “pseudogene”. M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Fermentas, US). G+: Controle positivo de *S. Gallinarum* (SG287/91). P+: Controle positivo *S. Pullorum* (SP449/87). CN: Controle negativo. Números arábicos: estirpes testadas. Seta branca: “Amplicon” esperado no biovar *Pullorum* presente em estirpe do biovar *Gallinarum*.....39

ANÁLISE COMPARATIVA DOS GENOMAS DE *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR Gallinarum BIOVARES Gallinarum 287/91 E Pullorum 449/87 PARA IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE DIFERENÇAS (RODS)

RESUMO – *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) é o agente causador do tifo aviário, uma doença septicêmica que afeta principalmente aves adultas. Enquanto que *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*) é o micro-organismo causador da pulorose, uma doença sistêmica de aves jovens que evolui para infecção persistente em algumas das que se recuperam da enfermidade. Essas bactérias são genética e fenotipicamente semelhantes, mas causam doenças distintas nos seus hospedeiros. Ainda não se sabe quais seriam as informações genéticas responsáveis pelas diferenças na patogenia e epidemiologia do tifo aviário e da pulorose. Com o intuito de investigar essas diferenças, realizou-se o presente estudo, o qual teve por objetivo a comparação dos genomas de *S. Gallinarum* 287/91, *S. Pullorum* 449/87 e de *S. Pullorum* RKS5078 para identificação de regiões de diferenças (“regions of difference” – RODs). Foram identificadas e caracterizadas 68 RODs, buscando correlacioná-las com a patogenicidade desses micro-organismos. Além disso, verificou-se a conservação de algumas dessas RODs em 25 estirpes de *S. Gallinarum* e 17 de *S. Pullorum*, todas isoladas de aves com tifo aviário ou pulorose. De modo geral, as RODs continham genes relacionados à funções celulares (reparo de DNA e desagregação de proteínas celulares), produção de energia e virulência. No presente estudo foi observado que a maioria das RODs conservadas era gerada por deleções que, putativamente, provocaram perda de sua função em *S. Pullorum*. Por esse motivo, foi possível sugerir que a diferente epidemiologia de *S. Pullorum* poderia ser decorrente de perdas gênicas e não de características adquiridas. Após a análise da conservação das RODs, as estirpes de ambos os biovars foram agrupadas em um dendrograma que as separou em cinco grupos (dois de *S. Pullorum* e três de *S. Gallinarum*). Esses dados sugerem que o genoma sequenciado da estirpe 287/91 de *S. Gallinarum* não representaria toda a variabilidade genética desse biovar havendo, portanto, a necessidade de futuro sequenciamento de outras estirpes. Esses novos genomas poderiam enriquecer as comparações genômicas entre *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

Palavras-chave: Comparação de genomas, tifo aviário, pulorose, Patogenia, PCR, *Salmonella*

COMPARATIVE ANALYSIS OF *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SEROVAR Gallinarum BIOVARES Gallinarum 287/91 AND Pullorum 449/87 GENOMES TO IDENTIFY REGIONS OF DIFFERENCE (RODS)

ABSTRACT – *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*) is the causative agent of fowl typhoid, a septicaemic disease that affects mainly adult birds, whereas *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum (*S. Pullorum*) causes pullorum disease, a systemic disease of young birds that can evolve for persistent infection in some of the birds that recovered. These two bacteria are genetic and phenotypically similar but cause distinct diseases. The genetic bases that would be responsible for these differences are still unknown. For this reason the present study was elaborated and aimed at comparing *S. Gallinarum* 287/91, *S. Pullorum* 449/87 and *S. Pullorum* RKS5078 whole genomes in order to identify regions of difference (RODs). In total, 68 RODs were identified and characterized attempting to correlate them with pathogenicity features of *S. Gallinarum* and *S. Pullorum*. Furthermore, the conservation status of some RODs was verified in 25 strains of *S. Gallinarum* and 17 strains of *S. Pullorum*, all of them isolated from birds with fowl typhoid or pullorum disease. Overall, the RODs have genes involved in cellular functions (as DNA repair and protein disaggregation), energy production and virulence. In the present study, it was noticed the majority of conserved RODs were generated by deletions in genes which, putatively, would lead to loss of their function in *S. Pullorum*. Consequently, it was feasible to suggest that *S. Pullorum* epidemiology would be a negative characteristic stemming from gene losses rather than acquired features. After ROD conservation analysis, the strains from both biovars were grouped in a dendrogram which split *S. Pullorum* strains into two groups and *S. Gallinarum* strains into three. These data suggest that sequenced genome of *S. Gallinarum* 287/91 could not support all genetic variability from this biovar and, hence, it is important to sequence more *S. Gallinarum* genomes to enrich the comparative analysis between these two biovars.

Key-words: Genome comparison, fowl typhoid, pullorum disease, pathogenesis, *Salmonella*, PCR

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira possui grande importância no cenário nacional e mundial. Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF) (2012), o país se mantém como maior exportador e terceiro maior produtor mundial de carne de frango. No Brasil, o setor emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional.

O crescimento da avicultura brasileira tem sido impulsionado por avanços nas áreas do melhoramento genético, manejo, nutrição e da sanidade. Na maioria das vezes, o melhoramento genético é realizado com intuito de melhorar as características de produção dos animais. No entanto, esse tipo de seleção desfavorece a fixação dos genes que conferem maior resistência contra as enfermidades, levando as aves comerciais a se tornarem cada vez mais susceptíveis aos patógenos. Aliado a isso, práticas de manejo como o adensamento populacional nas granjas também favorecem a ocorrência de doenças. Portanto, os programas de controle e vigilância sanitária adotados são imprescindíveis na avicultura moderna.

A Organização Internacional de Epizootias (OIE) considera algumas doenças como de notificação obrigatória. Dentre elas estão o tifo aviário e a pulorose, causadas por *Salmonella Gallinarum* e *S. Pullorum*, respectivamente. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) prevê que o núcleo ou estabelecimento avícola deve ser livre dessas duas enfermidades (BRASIL, 2003). O tifo aviário é uma doença de caráter septicêmico de curso agudo ou crônico, que pode acometer aves em qualquer idade, embora seja mais comumente observada em adultas. A pulorose pode acometer aves em qualquer idade, porém é naquelas na primeira semana de vida que a enfermidade se manifesta na sua forma mais agressiva, com alta mortalidade ocasionada pela severidade da infecção sistêmica. Além disso, *S. Pullorum* induz infecção persistente, que seria a chave para a transmissão vertical desse micro-organismo.

Nos países desenvolvidos, essas enfermidades são consideradas controladas sendo, portanto, um problema de países em desenvolvimento, principalmente naqueles onde as medidas de controle em vigor não são eficientemente aplicadas

ou as condições climáticas favorecem a permanência e o desenvolvimento do patógeno, como o Brasil. Estudos anteriores demonstraram que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são filogeneticamente próximas, possuindo conteúdos genéticos semelhantes. No entanto, ainda não são conhecidas as razões pelas quais esses micro-organismos causam doenças com epidemiologias e patogenias distintas.

Estudos de filogenia demonstraram que *S. Enteritidis* seria o último ancestral comum de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. *S. Enteritidis* é capaz de acometer várias espécies animais nas quais causa uma gastroenterite. Nesse contexto, a utilização de *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* como modelos para estudos de genômica funcional e patogenicidade seria apropriada por duas razões, a princípio. *S. Enteritidis* pode acometer uma variedade de hospedeiros, inclusive as aves, enquanto que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são restritas a essas; no entanto, esses dois últimos micro-organismos possuem patogenicidade e transmissão diferentes.

Os resultados de um estudo prévio demonstraram que as diferenças de patogenicidade e especificidade de hospedeiro existente entre *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* podem estar relacionadas ao elevado acúmulo de “pseudogenes” nessa última e à presença de regiões de diferença (RODs) entre esses genomas. Portanto, é possível que as diferentes patogenias e epidemiologias do tifo aviário e da pulrose também estejam correlacionadas às diferenças entre os conteúdos genéticos dos agentes causadores dessas enfermidades. Diante dessa hipótese, o presente estudo foi elaborado e teve como objetivos: (1) a comparação de genomas de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* para identificação de RODs, (2) a verificação da conservação das RODs em isolados de campo de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* por meio de PCR convencional e (3) a caracterização do conteúdo gênico das RODs conservadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais do gênero *Salmonella*

Salmonella spp. são patógenos intracelulares facultativos pertencentes à família das *Enterobacteriaceae* (MARCUS et al., 2000). São caracterizadas como bastonetes Gram-negativos, geralmente móveis devido aos flagelos peritríquios. São mesófilas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, fermentadoras de glicose e não formadoras de esporos (GRIMONT et al., 2000; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A história do gênero *Salmonella* se iniciou em 1880 a partir da identificação de um bacilo à análise de fragmentos de baço e linfonodos mesentéricos de um paciente que veio a óbito devido à febre tifoide. O nome do gênero se deve a Daniel Salmon que em 1886 isolou um bacilo de suínos doentes e erroneamente o considerou o agente da peste suína. Posteriormente, este agente foi identificado como *S. Choleraesuis* e, desde então, vários sorovares têm sido isolados e identificados a cada ano. O gênero *Salmonella* é composto por 2.610 sorovares classificados pela combinação de 46 antígenos somáticos (O) e 114 antígenos flagelares (H) (GRIMONT; WEILL, 2007; MCQUISTON et al., 2008; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A classificação e taxonomia do gênero sofreram várias mudanças ao longo do tempo. A eletroforese de isoenzimas ("Multilocus Enzyme Electrophoresis" ou MLEE) (REEVES et al., 1989) e hibridização entre DNAs (WAYNE et al., 1987) foram as primeiras técnicas moleculares utilizadas com intuito de agrupar as espécies e subespécies do gênero. Os sorovares mais comumente isolados nos casos clínicos em animais e humanos compartilham mais de 85% da sua informação genética (CHAN et al., 2003).

O sistema de nomenclatura mais aceito entre os pesquisadores é o proposto por Le Minor e Popoff (1987) que divide o gênero nas espécies *bongori* e *enterica*. Essa última, por sua vez, é dividida em seis subespécies, *enterica*, *salamae*,

arizonae, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Portanto, quando se diz *Salmonella* Enteritidis, deve-se entender que a nomenclatura completa deste sorovar é *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis. Análises de MLEE demonstram que a subsp. *houtenae* possui alguns sorovares com perfis genéticos diferentes dos demais, sugerindo a existência de uma outra subespécie, que foi denominada de subsp. VII (BOYD et al., 1996). Essa ainda não foi oficialmente reconhecida e não há uma única prova bioquímica que identifique e separe os seus indivíduos daqueles da subespécie *houtenae* (MCQUISTON et al., 2008).

Somente uma pequena parte dos sorovares está ligada a quadros infecciosos em seres humanos e animais. *S. enterica* subsp. *enterica* detém cerca de 60% dos sorovares conhecidos e é responsável por 99% das salmoneloses em aves e mamíferos. *S. bongori* e *S. enterica* subsp. *arizonae* estão associadas a doenças em répteis e anfíbios, embora possam, eventualmente, causar doença sistêmica grave nos seres humanos (MCCLELLAND et al., 2001; CHAN et al., 2003).

Espécimes do gênero *Salmonella* diferem quanto ao grau de adaptação e a variedade de hospedeiros que podem infectar (ESWARAPPA et al., 2009). Aqueles causadores de zoonoses, normalmente, possuem a habilidade de infectar vários hospedeiros e de potencialmente lhes causar doença. São associados a quadros com comprometimento gastrointestinal que tendem a ser autolimitantes em pacientes saudáveis. Por outro lado, outros sorovares são restritos ou adaptados a um hospedeiro, sendo responsáveis por desencadear uma doença mais severa, do tipo tifoide, na qual o micro-organismo alcança os órgãos do hospedeiro por meio da circulação, podendo levá-lo a óbito na ausência de um tratamento (CHAN et al., 2003; THOMSON et al., 2008). Em galinhas, exemplos de sorovares que causam gastroenterite e doença sistêmica são *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum*, respectivamente.

Nos últimos anos, a disponibilidade de tecnologias de sequenciamento de material genético permitiu melhor compreensão das relações filogenéticas dos micro-organismos do gênero *Salmonella*. De acordo com McQuiston et al. (2008), *Salmonella* teria divergido juntamente com *Escherichia coli* de um ancestral em comum há aproximadamente 100 milhões de anos e *S. bongori* seria a linhagem mais antiga existente desde então. Ainda de acordo com esses autores, análises de

“house-keeping genes” (genes envolvidos em funções essenciais à célula) e genes de virulência demonstram que as subespécies *arizonae*, *houteanae*, *diarizonae*, *salamae*, *indica* e *enterica* teriam divergido sucessivamente a partir de *S. bongori*.

As espécies e subespécies de *Salmonella* spp. evoluíram como linhagens separadas a partir de um mesmo ancestral (linhagens clones) e a fluidez genética observada na forma de aquisição e perdas de genes é provavelmente a principal razão da diferenciação ocorrida entre elas (MCQUISTON et al., 2008). A proximidade filogenética aliada a recente história evolutiva do gênero se refletem na alta similaridade observada nos estudos de genética comparativa. Crosa et al. (1973) foram os primeiros a relatar a origem clonal no gênero e a considerar a proximidade filogenética entre os sorovares. Posteriormente, essa semelhança foi demonstrada por análises de sequências de “house-keeping genes” e RNA ribossômico 16S que apresentaram similaridade de 96 e 99%, respectivamente, entre os sorovares testados (EDWARDS; OLSEN; MALOY, 2002; PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

Considerando a alta similaridade genética observada entre os membros do gênero *Salmonella*, Porwollik, Wong e McClelland (2002) levantaram a hipótese da existência de um “pool” de genes compartilhados entre os sorovares. Esses autores realizaram um estudo, incluindo membros de todas as subespécies e outras enterobactérias e identificaram um conjunto de genes (“core genes”) que eram compartilhados por todas as subespécies de *Salmonella*. Esses genes representaram em torno de 4% do genoma de *S. Typhimurium* LT2. Houve disparidades na conservação de genes ligados a virulência como fímbrias, flagelos e ilhas de patogenicidade. A constatação de reorganizações pontuais no genoma, aliado a alta homologia observada entre alguns genes de *Salmonella* e outras enterobactérias, sugerem que exista fluidez genética entre os sorovares e uma ampla capacidade de intercâmbio genético, dentro do próprio gênero ou com outros micro-organismos que habitam no trato intestinal (PORWOLLIK; WONG; MCCLELLAND, 2002).

Em um estudo semelhante, porém mais restrito, Chan et al. (2003) utilizando microarranjo identificaram mais de 2.000 genes (54% do total testado) que eram comuns a *S. bongori* e as subsp. *enterica* e *arizonae*. Esse conjunto de genes

estava relacionado a funções celulares essenciais, como metabolismo, biossíntese de moléculas, transporte de íons, replicação do DNA, transcrição, tradução e divisão celular.

A partir dos dados gerados até o momento pode-se conjecturar sobre o caminho evolutivo percorrido para a diferenciação das espécies e subespécies de *Salmonella*, porém esses dados ainda não permitem uma clara compreensão das bases genética que tornaram possível a emergência desses micro-organismos como patógenos ou que permite as diferentes interações dos sorovares com os seus hospedeiros.

2.2. Salmoneloses Aviárias – Tifo aviário e pulorose

S. Gallinarum e *S. Pullorum* apresentam algumas particularidades em relação aos demais membros do gênero *Salmonella*. Não possuem flagelos, são restritas a aves e produzem H₂S lentamente, o que dificulta o isolamento em meios de cultura semi-sólidos baseados na presença deste componente (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Atualmente, são classificadas como biovars do sorovar *Gallinarum*. Portanto, a nomenclatura correta seria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Gallinarum* biovar *Gallinarum* e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar *Gallinarum* biovar *Pullorum* (POPOFF; LE MINOR, 2005).

São três os tipos de enfermidades causadas por *Salmonella* spp. em aves. O tifo aviário, causado por *Salmonella* *Gallinarum*, a pulorose, causada por *Salmonella* *Pullorum* e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar capaz de infectar as aves (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). O tifo aviário é uma doença de caráter septicêmico de curso agudo ou crônico, que pode acometer aves em qualquer idade, embora seja mais comumente observada em adultas (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). A morbidade é alta e a mortalidade é variável e dependente de fatores como a dose e a patogenicidade da estirpe infectante, a idade da ave afetada, a linhagem, o manejo sanitário, o estado nutricional dos animais e a presença de outras doenças concomitantes (SHIVAPRASAD, 2000). A

mortalidade geralmente inicia-se de 5 a 7 dias após a infecção inicial e dura até em torno do 14º dia. As aves de linhagens leves são menos afetadas pelo tifo aviário, porém permanecem portadoras da bactéria por várias semanas (BERCHIERI JÚNIOR et al., 2000; BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; DE OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2005).

A pulorose pode acometer aves em qualquer idade, porém é nas jovens que a doença apresenta um quadro clínico bastante severo e com alta mortalidade (BARROW; FREITAS NETO, 2011). Em pintainhos, caracteriza-se como uma doença septicêmica aguda e o pico de mortalidade ocorre em aves com duas a três semanas de vida (OIE, 2012). Animais adultos que apresentam bom estado nutricional e nenhuma imunodeficiência, caso sejam infectados por *S. Pullorum*, podem não apresentar quadro clínico. Porém, quando a doença se desenvolve pode ser confundida com o tifo aviário, paratifo aviário ou outras enfermidades bacterianas (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Ao contrário do que ocorre no tifo aviário, que tem a transmissão horizontal como importante via de transmissão, na pulorose, a transmissão transovariana ou vertical é frequentemente observada e pode ser relacionada a menores taxas de nascimento nos incubatórios ou a altas taxas de mortalidade nos neonatos, além de servir como meio de propagação da bactéria para as granjas (PINHEIRO; DE OLIVEIRA; BERCHIERI JUNIOR, 2001; BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009; OIE, 2012).

O tifo aviário e a pulorose são doenças de notificação obrigatória segundo a Organização Internacional de Epizootias (OIE) e são considerados controlados nos países desenvolvidos. Porém, naqueles em desenvolvimento, onde as medidas de controle em vigor não são aplicadas de forma eficiente ou as condições climáticas e ambientais favoreçam a permanência e multiplicação de micro-organismos, essas duas enfermidades ainda ocorrem com frequência (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001). Grande parte do sucesso no controle de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em países desenvolvidos deve-se a rígidos programas de controle. Tais programas se basearam na higiene, limpeza, desinfecção de instalações, controle de pragas (roedores e insetos), retirada das aves mortas, identificação do micro-organismo (técnicas bacteriológicas e sorológicas) e abate sanitário dos animais doentes e portadores (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

Uma vez que um surto de pulorose ou tifo aviário se instala em uma granja, o abate dos animais infectados deve ser executado visando evitar a propagação dessas enfermidades (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Logo, fica claro que a prevenção do tifo aviário e pulorose associada a um diagnóstico seguro são peças chaves no controle destas enfermidades. Neste sentido, o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) preconiza que o teste de soroaglutinação rápida (SAR) feito com sangue total deve ser executado em 100% das aves reprodutoras de linhagens puras, bisavós e avós em início de produção a fim de garantir a ausência de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* no plantel (BRASIL, 2003).

O diagnóstico seguro baseia-se no isolamento do micro-organismo e sua identificação sorológica, baseada nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), e provas bioquímicas (GRIMONT; WEILL, 2007; MCQUISTON et al., 2008). Como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* possuem os mesmos antígenos de superfície e ausência de flagelos, é possível identificá-las, mas não diferenciá-las por sorologia (GRIMONT; WEILL, 2007). Deste modo, a diferenciação tem sido baseada nos comportamentos bioquímicos frente ao dulcitol e a ornitina. Quanto a esses compostos, o biovar *Gallinarum* somente fermenta o carboidrato dulcitol e o biovar *Pullorum* somente faz descarboxilação do aminoácido ornitina (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009), sendo que a descarboxilação da ornitina seria a prova de eleição para distingui-los (TRABULSI; EDWARDS, 1962).

A existência de estirpes de ambos os biovars com comportamento bioquímico atípico dificulta a diferenciação (CRICHTON; OLD, 1990). Por este motivo, nos últimos anos, houve esforços da comunidade científica no intuito de desenvolver um teste para diferenciação dos dois biovars que não dependesse de características fenotípicas. Praticamente todos esses ensaios se apoiaram em métodos moleculares baseados em sequências do DNA bacteriano, como por exemplo, ribotipagem, eletroforese de campo pulsado (PFGE), polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e, mais recentemente, reação em cadeia da polimerase para genes polimórficos (PARK et al., 2001; DESAI et al., 2005; KISIELA et al., 2005; SHAH et al., 2005; PAIVA et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; KANG et al., 2011; BATISTA et al., 2013).

2.3. O genoma de *Salmonella*

O aumento exponencial dos dados gerados por comparação entre genomas tem mostrado que o genoma bacteriano não é uma estrutura estática, mas ao contrário, está em constante evolução dirigida pelos processos de pressão seletiva ao qual está sujeito. Essa dinâmica de genes em um genoma é conhecida como plasticidade e está relacionada ao desenvolvimento de características adaptativas, envolvendo eventos tais como mutações pontuais (que modificam uma base, podendo ou não alterar o aminoácido codificado), recombinação homóloga, rearranjos do DNA e transferência gênica lateral ou horizontal de genes (TGL) (DOBRINDT; HACKER, 2001). Em *Salmonella*, a plasticidade está principalmente ligada à transferência gênica lateral e a aquisição de genes de virulência, na forma de profagos, ilhas de patogenicidade, entre outros (flagelos e fímbrias) (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

A TGL tem sido amplamente descrita em diversos gêneros bacterianos, incluindo *Salmonella*, e seria uma das causas associadas à emergência e evolução de patógenos (DOBRINDT; HACKER, 2001; PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003; MCQUISTON et al., 2008). Análises do genoma de *S. Typhimurium* LT2 mostram que em torno de 25% das “Open Reading Frames” (ORFs) detectadas teriam sido adquiridas por TGL após a divergência de *Salmonella* do seu último ancestral comum (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

São conhecidos três mecanismos envolvidos na TGL. A primeira seria a conjugação bacteriana, que envolve a transferência de material genético por contato direto entre a célula doadora e a receptora. A segunda seria a transformação, que consiste na captação de material genético do ambiente pelo micro-organismo. E por último, a transdução, na qual ocorre a transferência de DNA mediada por vírus bacteriófagos. Nesse sistema, a célula receptora sofre um processo conhecido como conversão lisogênica na qual o DNA do vírus se integra ao cromossomo bacteriano (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003). A incorporação do conteúdo genético pela bactéria, normalmente determina novas características que podem favorecer a adaptação ao seu nicho (DOBRINDT; HACKER, 2001).

Em *Salmonella* spp., a incorporação de genes por meio de plasmídios, profagos, ilhas de patogenicidade, elementos genéticos móveis (“transposons”) e elementos de inserção (IEs) se mostra como um evento relevante no desenvolvimento de ferramentas adaptativas (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003). A presença de plasmídios nos sorovares de *Salmonella* tem sido relatada há vários anos (CHRISTENSEN et al., 1992, MCCLELLAND et al., 2001, PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003; THOMSON et al., 2008; BARROW; FREITAS NETO, 2011). A maioria dos plasmídios possuem genes de virulência e podem ser conjugados entre células bacterianas (DOBRIDNT; HACKER, 2001).

Em *S. Typhimurium* LT2, o plasmídio pSLT alberga os “operons” do plasmídeo de virulência de *Salmonella* e um homólogo do “operon” *tra*, que é responsável pela sua autotransmissão (MCCLELLAND et al., 2001). Em *S. Typhi* CT18, uma estirpe multirresistente, foram descobertos dois plasmídios de virulência. O primeiro, chamado de pHCM1, possui alta transmissibilidade e codifica genes de resistência a várias classes de antibióticos; o segundo, chamado de pHCM2, tem alta similaridade com um plasmídio de virulência de *Yersinia pestis*, o agente etiológico da peste negra (PARKHILL et al., 2001). O plasmídio de virulência encontrado em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* se mostrou crucial para o desenvolvimento do tifo aviário e pulrose em aves infectadas por via oral (BARROW et al., 1987; BARROW; LOVELL, 1988). A identificação desses elementos móveis nos vários sorovares sugere que seus produtos gênicos são relevantes para a patogenia de *Salmonella* spp. (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

Outro elemento associado à evolução de bactérias patogênicas é o profago. Quando a bactéria é infectada por um bacteriófago de ciclo lisogênico (não leva a célula bacteriana ao rompimento), o DNA do vírus se incorpora ao cromossomo do micro-organismo e passa a ser chamado de profago. Nesse processo, denominado de conversão lisogênica, alguns dos genes do profago seriam transcritos e traduzidos na célula hospedeira alterando o seu fenótipo (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

Genes de profagos têm sido identificados nos genomas de *Salmonella* spp. e as funções de alguns deles descritas (MCCLELLAND et al., 2001; PARKHILL et al.,

2001; PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003; THOMSON et al., 2008). Por exemplo, os genes do profago Gifsy-2 estão relacionados à habilidade de *S. Typhimurium* causar doença sistêmica em camundongos (PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003). Os genes *ssel*, *sopE* e *sspH2* seriam exemplos desses genes inseridos nas ilhas de patogenicidade (THOMSON et al., 2008). Eles codificam proteínas efetoras responsáveis por interferir na fisiologia da célula e modular a resposta do hospedeiro (KIMBROUGH; MILLER, 2000). Em alguns casos, são os remanescentes de profagos que possuem os genes responsáveis por conferir características de virulência aos seus hospedeiros. Em *S. Enteritidis*, os profagos remanescentes ϕ SE10 e ϕ SE12A, por exemplo, possuem alta similaridade com o profago Gifsy-2 do sorovar *Typhimurium* (THOMSON et al., 2008).

As regiões do cromossomo bacteriano que contêm elementos móveis são pontos de preferência para a inserção de ilhas genômicas lateralmente adquiridas (VIEIRA et al., 2009). Por definição, as ilhas genômicas são regiões extensas de DNA, normalmente maior que 10 Kb, associadas à profagos, integrases e “transposons” e que frequentemente estão inseridas dentro de “operons” de RNA transportador (tRNA) (LAWRENCE; HENDRICKSON, 2005; VIEIRA, 2009). Quando o conjunto de genes que as compõe está implicado em virulência, essas ilhas passam a ser chamadas de ilhas de patogenicidade (DOBRINDT; HACKER, 2001).

Ilhas de patogenicidade em *Salmonella* spp. (SPIs - “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) têm sido descritas e estudadas (MARCUS et al., 2000; JONES et al., 2001; MCCLELLAND et al., 2001; PARKHILL et al., 2001; DIEYE et al., 2009; BLONDEL et al., 2010). As SPIs são caracterizadas por não apresentarem homólogos no genoma de *E. coli*, possuírem média de conteúdo de guanina e citosina (conteúdo G + C) diferente da média geral do genoma, estarem inseridas preferencialmente dentro de genes de tRNA e possuírem genes distintos com funções comprovadas na patogenicidade da bactéria (MARCUS et al., 2000; PORWOLLIK; MCCLELLAND, 2003).

De modo geral, as SPIs permitem o estabelecimento de relações específicas entre o micro-organismo e o hospedeiro e são requeridas para a patogenicidade bacteriana (MARCUS et al., 2000). As mais estudadas e caracterizadas em *Salmonella* spp. são as SPI-1 e SPI-2, as quais codificam proteínas reguladoras e

efetoras e uma espécie de microseringa, chamada de sistemas de secreção do tipo III (T3SS) (MARCUS et al., 2000). Em resumo, os genes da SPI-1 estão relacionados à reorganização do citoesqueleto do hospedeiro, invasão do epitélio intestinal e estabelecimento de um ambiente intracelular adequado à sobrevivência da bactéria. Já os genes da SPI-2 manipulam o tráfego das vesículas lisossomais e aumentam a sobrevivência do micro-organismo no interior dos macrófagos (HAPFELMEIER et al., 2005).

A SPI-1 parece ser mais relevante que a SPI-2 nas infecções por sorovares de *Salmonella* que comprometem primariamente o trato gastrointestinal do animal. Em um estudo realizado por Dieye et al. (2009), a SPI-1 se mostrou fundamental para a colonização dos enterócitos de galinhas infectadas oralmente com *S. Typhimurium*. Nesse estudo, os autores concluíram que a SPI-2 funcionaria como um inibidor de atividade da SPI-1, visto que as estirpes que tiveram a SPI-2 eliminada *in vitro* foram mais eficientes na colonização do intestino, *in vivo*. Em contraste, a SPI-2 demonstrou ser mais importante do que a SPI-1 para aqueles sorovares que causam doença do tipo tifoide. Estirpes de *S. Gallinarum*, que são capazes de causar uma doença do tipo tifoide e possuem a habilidade de invadir e sobreviver nos macrófagos, foram atenuadas por inativação de genes da SPI-2 (JONES et al., 2001). Esse resultado sugere a importância da SPI-2 para a sobrevivência dessa bactéria nos macrófagos e sua subsequente propagação pelo organismo do hospedeiro. Até o momento foram identificadas 22 SPIs e outros sistemas de secreção, como o do tipo seis (T6SS) codificado pelas SPI-19 e SPI-22 em *S. Gallinarum* e *S. bongori*, respectivamente (BLONDEL et al., 2010; FOOKES et al., 2011).

2.4. Genômica de *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum

Salmonella enterica possui representantes que são restritos a um hospedeiro onde normalmente provocam uma doença sistêmica e também aqueles capazes de infectar vários hospedeiros provocando-lhes uma gastroenterite. Por exemplo, *S. Enteritidis* possui a capacidade de infectar mamíferos e aves, enquanto que *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são restritas as aves (THOMSON et al., 2008). Os mecanismos genéticos, obtidos ou perdidos ao longo do processo evolutivo, que levam um micro-organismo a se tornar restrito a um único hospedeiro têm impulsionado muitas pesquisas nos últimos anos. Para este propósito, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são modelos bastante atraentes de estudo, uma vez que possuem diferentes patogenias, porém especificidade em comum de hospedeiro além de genomas completamente sequenciados e disponíveis para análises.

A teoria aceita para a evolução dos biovars *Gallinarum* e *Pullorum* é que esses são de origem clonal e ambos divergiram de forma independente a partir de um ancestral em comum próximo à *S. Enteritidis* (LI et al., 1993; OLSEN et al., 1996; THOMSON et al., 2008; BARROW; FREITAS NETO, 2011). Esse ancestral teria perdido a capacidade de produzir flagelos devido a mutações e divergido como um novo indivíduo por acúmulo de mutações neutras (LI et al., 1993).

De acordo com estudos realizados por Olsen et al. (1996), as estirpes de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* analisadas apresentavam, dentro de cada biovar, o mesmo padrão molecular nos testes de IS200, ribotipagem e eletroforese de campo pulsado (PFGE) e podiam ser agrupadas por perfis genéticos. Resultado semelhante foi descrito por Li et al. (1993) ao agruparem estirpes dos biovars *Gallinarum* e *Pullorum* dentro de dois grupos distintos com base no fenótipo e perfil isoenzimático (perfil eletroforético) obtido por MLEE. Esses autores notaram também a existência de estirpes com perfis isoenzimáticos destoantes do esperado que, por apresentarem características fenotípicas e isoenzimáticas ambíguas, não puderam ser agrupadas dentro de um ou outro biovar. Esses isolados foram denominados de estirpes intermediárias tendo sido descritas por outros autores (OLSEN et al., 1996; PORWOLLIK et al., 2005).

Estudos sobre a composição e estrutura dos genomas dessas duas bactérias foram realizados por meio de mapeamento genético das estirpes RKS5078 de *S. Pullorum* (SP RKS5078) (LIU et al., 2002) e SARB21 de *S. Gallinarum* (SG SARB21) (WU et al., 2005). Quando comparados ao genoma previamente mapeado de *S. Typhimurium* (mapa padrão), os mapas dos dois biovars apresentavam-se rearranjados. A alteração na ordem dos fragmentos gerados pela enzima I-CeuI em genes de RNA 23S do ribossomo (fragmentos *rrnD* e *rrnE*) se manteve conservada nos dois biovars e foi sugerida como possível fator de adaptação desses micro-organismos ao hospedeiro (WU et al., 2005). Além disso, identificou-se algumas inserções e deleções comuns, incluindo-se a ausência, tanto em SP RKS5078 como em SG SARB21, de quatro profagos que haviam sido identificados em *S. Typhimurium*. Dentre as diferenças entre os mapas, observou-se que aquele de SG SARB21 foi 190 Kb menor que o de SP RKS5078. Ainda foram descritas inserções e deleções específicas em cada biovar (WU et al., 2005).

Embora os dados gerados no mapeamento ainda não representassem toda a extensão do genoma, foi possível mapear a posição de cerca de 100 genes no biovar *Pullorum* e 60 no biovar *Gallinarum*, além de possibilitar a detecção de rearranjos em ambos os genomas (LIU et al., 2002; WU et al., 2005). Esses dados aumentaram consideravelmente o conhecimento sobre a composição genética de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, embora ainda não tornassem possível uma abordagem comparativa mais profunda e complexa entre essas bactérias.

Aproveitando a disponibilidade de técnicas moleculares mais avançadas, como o microarranjo, Porwollik et al. (2005) compararam diferentes estirpes de *S. Enteritidis* entre si e essas com outras de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Dublin*, isoladas em diferentes países e épocas. Porwollik et al. (2005) observaram, em *S. Pullorum*, deleções no sistema regulatório *tor*, que codifica componentes para um sistema respiratório bacteriano e está envolvido na proteção do micro-organismo durante exposição a pH elevado. Ainda segundo esses autores, também foram observadas deleções em um homólogo do gene *rpoS* (proteção contra estresse) e em uma região que estaria envolvida na invasão de células eucarióticas. A estirpe SARB52 de *S. Pullorum* apresentou algumas características genéticas incomuns para esse biovar. Dentre elas estão às ausências do “operon” *stc* (codifica fímbria),

de genes de resistência a choque térmico (*hsc*) e de transportadores ABC. Em contraste, detectou-se a presença de fimbrias *stj* e *sta*, descritos anteriormente apenas em *S. Typhimurium* e em *S. Typhi*, respectivamente (PORWOLLIK et al., 2005).

Quanto à *S. Gallinarum*, Porwollik et al. (2005) observaram a ausência de duas regiões envolvidas em motilidade, aderência bacteriana e quimiotaxia. A ausência das fimbrias codificadas pelo “operon” *std*, foi novidade, uma vez que elas tinham sido detectadas em todos os sorovares da subespécie *enterica* até o momento e, essa ausência em genes relacionados à quimiotaxia, teria sido observada pela primeira vez em *Salmonella* spp. (PORWOLLIK et al., 2005).

Sabe-se que a dinâmica de genes (aquisição e perda) no genoma está envolvida no surgimento e evolução de um determinado patógeno e que a organização do seu conteúdo genético reflete o estilo de vida por ele adotado. Dobrindt e Hacker (2001) afirmaram que patógenos intracelulares tendem a evoluir por meio de redução do genoma (evolução por redução) que é caracterizada pela perda de genes que não são essenciais. De acordo com os dados de Thomson et al. (2008), o biovar *Gallinarum* seria um exemplo de micro-organismo que sofre esse tipo de processo evolutivo. Foi sugerida por esses autores uma possível relação entre esta redução e a restrição desta bactéria ao hospedeiro. Além disso, Thomson et al. (2008) presumiram que a adaptação ao hospedeiro teria ocorrido em paralelo ao abandono do estilo de vida intestinal e aquisição da habilidade de causar doença sistêmica.

A comparação dos genomas das estirpes P125109 de *S. Enteritidis* (*S. Enteritidis* PT4) e 287/91 de *S. Gallinarum* reforçaram a tese de que o sorovar *Gallinarum* teria divergido a partir do sorovar *Enteritidis* (THOMSON et al., 2008). Esse fato teria sido evidenciado pela alta similaridade dos genes ortólogos compartilhados nestes genomas (4.179 genes com 99,7% de similaridade) e a sintonia entre os “core genes”, inclusive nos sete “operons” de RNA ribossômico (rRNA) e nas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI).

Aparentemente, a única aquisição genética de *S. Gallinarum* 287/91 desde a sua divergência foi um conjunto de genes fimbriais, localizados no seu plasmídio de virulência (THOMSON et al., 2008). O genoma de *S. Gallinarum* apresenta acúmulo

de “pseudogenes” formados por substituição “nonsense” ou deleções, que em sua maioria alteraram o quadro de leitura dos nucleotídeos (“frameshift”). Essa perda gênica afeta em torno de 7% da capacidade de codificação deste biovar, envolvendo genes de muitas categorias funcionais, inclusive metabolismo e virulência (THOMSON et al., 2008).

Algumas das mutações que interferem no metabolismo microbiano provavelmente restringem a utilização de substratos como fonte de carbono e energia por *S. Gallinarum* (THOMSON et al., 2008). As mutações observadas nos “operons” *ttr*, *cbi* e *pdu* teriam o tornado incapaz de utilizar o 1,2 propanodiol para produção de energia. Essas mesmas mutações também ocorrem em *S. Typhi* e foram sugeridas como características de sorovares restritos ao hospedeiro (THOMSON et al., 2008). Além disso, os biovars *Gallinarum* e *Pullorum* seriam incapazes de produzir glicogênio devido a mutações nos genes *glgA*, *glgB* e *glgC* (MCMEECHAN et al., 2005; THOMSON et al., 2008).

De acordo com Thomson et al. (2008) muitos dos efetores parálogos do sistema de secreção do tipo três (TTSS) estavam ausentes nas ilhas de patogenicidade de *S. Gallinarum*. No entanto, ao menos as SPI-1 e SPI-2 parecem ser funcionais e positivamente selecionadas dentro deste biovar (ESWARAPPA et al., 2009). Análises de proteômica entre *S. Enteritidis* e *S. Gallinarum* demonstraram 23 proteínas superexpressas (“over expressed”) nesta última, sendo que algumas destas possuem funções como produção de energia, metabolismo, síntese de ácido nucleico e virulência. No entanto, entre as 11 proteínas com baixa expressão em *S. Gallinarum* estavam aquelas de proteção do DNA, proteínas de transporte de ferro entre outras (OSMAN et al., 2009).

Observou-se elevada degradação nos “operons” fimbriais do biovar *Gallinarum*. Thomson et al. (2008) observaram a ausência das fímbrias codificadas pelo “operon” *std*. Nos 12 “operons” fimbriais restantes, havia oito apresentando mutações deletérias em algum dos seus genes. Este nível elevado de mutações dentro de genes codificadores de fímbrias foi atribuído à adaptação ao hospedeiro, visto que situação similar foi observada em *S. Typhi*, que é restrita a humanos (THOMSON et al., 2008).

Uma vez que o primeiro genoma de *S. Pullorum* sequenciado só foi publicado em 2012 (FENG et al., 2012), estudos anteriores que abordaram a genômica comparativa nesse biovar envolveram outras técnicas moleculares. Através de hibridização subtrativa, Li, Xu e Jiao (2009) compararam fragmentos gênicos da estirpe C79-13 de *S. Pullorum*, CMCC(B) 50041 de *S. Enteritidis* e 9 de *S. Gallinarum* com o propósito de identificar genes de virulência que pudessem explicar as diferenças de patogenicidade. A comparação resultou na identificação de 20 fragmentos no biovar *Pullorum* com homologia à sequências de profagos, plasmídios, genes de virulência e colicinas.

À luz dos resultados gerados até o momento, percebe-se que há pouco conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pela especificidade de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* ao hospedeiro e sobre quais fatores estariam, de fato, relacionados às diferentes patogenias das enfermidades causadas por elas. Tem sido demonstrado que esses biovars possuem um plasmídio de virulência essencial para o desenvolvimento do tifo aviário e pulorose (BARROW et al., 1987; BARROW; LOVELL, 1988). No entanto, somente a sua presença não seria suficiente para tornar uma estirpe virulenta, sendo necessário que ocorra interações entre os genes do plasmídio de virulência com aqueles situados no cromossomo bacteriano (BARROW; LOVELL, 1989). Uma vez que as sequências genômicas proporcionam uma análise minuciosa do conteúdo genético, a comparativa entre os genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* poderia ajudar na compreensão do tifo aviário e da pulorose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Identificar regiões genômicas de diferença entre *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum que pudessem estar associadas à epidemiologia e patogenia do tifo aviário e da pulrose.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Analisar a organização e composição dos genomas de SP449/87 e SP RKS5078;
- 3.2.2. Comparar o genoma de SP449/87 com o de SG287/91 e SP RKS5078 para identificar regiões de diferenças (RODs);
- 3.2.3. Tentar correlacionar diferenças genéticas observadas nas RODs com as diferenças nas patogenidades dos dois micro-organismos;
- 3.2.4. Agrupar as estirpes testadas com base no perfil genético gerado pela PCR para verificação de conservação das RODs.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem e análise dos genomas

Os genomas de *S. Gallinarum* estirpe 287/91 (SG 287/91 – GenBank: AM933173.1) e da estirpe RKS5078 do biovar *Pullorum* (SP RKS5078 – GenBank: CP003047.1) disponíveis nos bancos de dados públicos mantidos pelo NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) foram recuperados para utilização. O genoma de SG287/91 possui 4.658.697 pares de bases (pb) com 3.965 genes anotados, enquanto que o de SP RKS5078 tem 4.637.962 pb com 4.325 genes anotados. O genoma da estirpe 449/87 de *S. Pullorum* (SP449/87) foi gentilmente cedido pelo Dr. Paul Andrew Barrow da “University of Nottingham” – UK. Essa estirpe foi isolada no Reino Unido e possui em torno de 4.664.194 pb e 4.691 genes pré-anotados.

Para comparação dos genomas utilizou-se o programa “Artemis Comparison Tools” (ACT) (CARVER et al., 2005) impondo-se um ponto de corte (“score cutoff”) de 80. A análise das regiões de diferença (RODs) encontradas foi feita nos programas “Basic Local Alignment Search Tool” (BLASTn e BLASTp) (ALTSCHUL et al., 1990) e “Multiple sequence alignment” (MultAlin) (CORPET, 1988). O genoma de *S. Enteritidis* PT4 (GenBank: AM933172.1) foi utilizado como referência para a análise das RODs.

4.2. Construção dos iniciadores

Para a verificação da conservação das RODs em isolados dos dois biovars, construíram-se iniciadores diretos e reversos (Invitrogen Corp., Califórnia, US e Sigma-Aldrich, Missouri, US) por meio da plataforma “on-line” Primer-BLAST (ROZEN; SKALETSKY, 2000). Os iniciadores tiveram como alvo a ROD em sua

totalidade ou parte desta. Para amplificação das RODs com mais de 3 kb foram utilizados mais de um par de iniciadores. Os iniciadores foram selecionados de modo que os produtos gerados tivessem tamanhos entre 200 pb e 1000 pb. As sequências utilizadas neste estudo estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Nome e sequência dos iniciadores e o tamanho esperado dos fragmentos nas estirpes padrão.

Nome do iniciador	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	
		S. Gallinarum 287/91	S. Pullorum 449/87
ROD1F	CGCCGTTTGGTCTGGCCGAT	538	462
ROD1R	TCAGCGGCGGCAATCACCTC		
ROD2F	ACCGTTTCTCTGATGGGCGGTA	669	185
ROD2R	TGGAGATGATAGCTCCCCGGCA		
ROD4F	GCGCTGGTGCCAGGAACCTT	392	316
ROD4R	GCCTGGATCGCCTCATCGCC		
ROD5F	GTGTGGATGCGGATGCGTGT	-	387
ROD5R	GATCGCGCGGCGAGAGAGTG		
ROD6F	ACCGCTGCCGTGGCTTTCTC	452	-
ROD6R	ACCAGTTGTCCGCGCAGGTG		
ROD7F	TACCAAATCGGCGCGCTGGG	415	316
ROD7R	CGCCGTCGCCATGAATGCAC		
ROD8F	GCGGCAAACTGGCGCAACA	564	298
ROD8R	ATCGTCGACGCCTTCTGCGG		
ROD9F	GTGGCGGGAGTTCTGGCGTC	805	487
ROD9R	GCGCAACCCGTCGCCTAACA		
ROD11F	ATGACCCGCAGCGTGCATCC	-	447
ROD11R	CTTGAGCGGCGCCAACCAGA		
ROD12F	TCGTCGGTCACCTCCGGCTC	326	254
ROD12R	CAGGCGTTCGACAAGGGCGA		
ROD13F	GCGCCATTACCAGCGTTGCC	513	635
ROD13R	GCGCATCGCGCAGGGATTTG		
ROD14.1F	CGCCCTCGCCAGTTCGATCC	532	-
ROD14.1R	CCCCAGCCAGAAGCACGCTC		
ROD14.2R	TGTTGCTTTTGGACGGATGCCA	307	-
ROD14.2R	CGCTCAGAACGTGGGGCGAA		
ROD15F	TGCAGGCCGAAGCGTAGCAG	664	283
ROD15R	ACAGCGTTGCGACTGTCCGGG		
ROD16F	TCGACAGAGCTGGGGCCGTT	328	-
ROD16R	ATCTGGCGCTAAGCCGGTGC		
ROD17F	GGCGATAACCACGGCAGCGA	528	-
ROD17R	GCGTGGAAGCGGCTGACGA		
ROD18F	AGCGACGCAGCCGGATGATG	-	306
ROD18R	TGCGGCTTACCCTGAGTTACGA		
ROD19F	CGCCGATCTACGCCGCCTTT	-	419

ROD19R	GGTCGTGGCGATACCCGCAG		
ROD20F	CCGGGGCGTGATTAGGGGA	-	356
ROD20R	CCCCATCTCCGCGGCGTTAAA		
ROD21F	GGCGTTAGCCGCAGGACGTT	469	722
ROD21R	AACCAGGTAATGCCGCCGCC		
ROD22F	CTCCGCCCCTGCGGCTAAAG	-	506
ROD22R	GGGACGCGTAAACCCGGCAA		
ROD23F	ATTTGCGCGCTGGTCGGCAA	-	735
ROD23R	ACGCTCAGCTTGCTCCTGCG		
ROD24F	CCGCCTGCGCGATGGCTTTA	-	260
ROD24R	TCTGGTTGACGGCGTGCGGA		
ROD25F	GGGGCTGCCATACAAGCGCA	692	618
ROD25R	TCGCCCTTCGGGCAGTCTCC		
ROD27F	CGCCAGCCCAACGCTCTCTT	294	236
ROD27R	AGCGGGGTCATCAGCCACCA		
ROD30F	GCTGCGGGAAACCGGCGTAT	1047	243
ROD30R	TCCATTGCGCAACGCCCTT		
ROD32F	GGGCGGCGAGTTACGTATTA	372	-
ROD32R	ATCTCCAGGCGTGAGTGTTG		
ROD33F	GAGCACCGCGTGCTGGATGT	-	312
ROD33R	ATCGCAGCCGGACAGGGGAT		
ROD33F/stdC	TACCCACCCACAGCGTCCG	-	331
ROD33R/stdC	TCTGGCTTAACGTGCGGGGC		
ROD33F/stdB	GCAAACGACACCGAGGCCGA	-	606
ROD33R/stdB	GGCAGGCCAGGGACAGGTTT		
ROD33F/stdA	AGTCACCGGGAGTGACGCCAT	-	336
ROD33R/stdA	CCGCCGACGCAACTACGGAA		
ROD34F	GGGTGGAACGCCCGGAAGTG	312	-
ROD34R	GAGTGGCGCGCAGTGTAGCA		
ROD36F	TCCAGCAAGTAAAGCCGGGTGG	162	209
ROD36R	TGGAGGCGGATAAGGTTGGGTG		
ROD37F	CGGTGGCAGGAATGCTGGGG	518	-
ROD37R	CGCGCCGGTCGAATAGTCCC		
ROD39F	CTGGGCACCTTCCTGGTGCG	528	456
ROD39R	CACCGCAATCCAGCAGGCCA		
ROD43F	ATGGCGAGTCCGCCAGAGT	273	-
ROD43R	GGCGGTATGCTGGTTGCCGT		

-: não há amplificação.

4.3. Origem dos micro-organismos

No presente estudo, foram utilizadas 42 estirpes, sendo 25 de *S. Gallinarum* e 17 de *S. Pullorum*, as quais foram fornecidas por Laboratórios Nacionais de Referência (LANAGRO e FIOCRUZ). A maioria das estirpes foi isolada de aves com

sintomatologia clínica de pulorose ou tifo aviário nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Santa Catarina e Mato Grosso em diferentes épocas. No entanto, duas foram provenientes do “American Type Culture Collection” (ATCC) e outra, isolada de aves com pulorose no Reino Unido (estirpe sequenciada). As informações disponíveis sobre as estirpes utilizadas encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Informações sobre as estirpes de *S. Gallinarum* e de *S. Pullorum* utilizadas nesse estudo.

Estirpe	Nome original	Biovar	Fonte	Local / ano isolamento	Fonte isolamento
1	SP CEPÁRIO M 191 - CR 31/06-1	Pullorum	LANAGRO	São Paulo / 2005	Órgãos de galinhas caipiras
2	SP CEPÁRIO 578 - CR 350/06	Pullorum	LANAGRO	São Paulo / 2006	Órgãos de poedeira comercial
3	SP CEPÁRIO 457 - CR 31/06	Pullorum	LANAGRO	São Paulo / 2005	Órgãos de galinhas caipiras
4	SG 2750/10-22	Gallinarum	LANAGRO	Rio Grande do Sul / 2010	Órgãos de Galinhas
5	SG ATCC 9184	Gallinarum	Fiocruz / INCQS 00378	-	
6*	SG 188-1c	Gallinarum	LANAGRO	-	
7	SP CEPÁRIO M 328 - CR 366/08	Pullorum	LANAGRO	Minas Gerais / 2008	“Pool” de ovários de avós
8	SP ATCC 9120	Pullorum	Fiocruz / INCQS 00261	-	
9	SP 11	Pullorum	LANAGRO	-	
10	SG 345/11	Gallinarum	LANAGRO	Rio Grande do Sul / 2011	Órgão de galinha
11	SP CEPÁRIO 783 - CR 135/07	Pullorum	LANAGRO	Minas Gerais / 2007	Órgãos de poedeira comercial
12	SP CEPÁRIO 459 - CR 32/06	Pullorum	LANAGRO	São Paulo / 2005	Órgãos de galinha caipira
13	SG 33 - IOC 1780/96	Gallinarum	Fiocruz	São Paulo / 1996	
14	SP SG 34 - IOC 4623/98	Gallinarum	Fiocruz	Minas Gerais / 1998	
15	MG SG 35 - IOC 4295/02	Gallinarum	Fiocruz	Minas Gerais / 2002	
16	MG SG 188-2	Gallinarum	LANAGRO	-	
17	SG 31 - IOC 3558/99	Gallinarum	Fiocruz	Rio Grande do Sul / 1999	
18	RS SP 8 - IOC 1771/96	Pullorum	Fiocruz	São Paulo / 1996	
19	SP SP 7 - IOC 9771/04	Pullorum	Fiocruz	Rio Grande do Sul / 2004	
20	RS SP 4 - IOC 1467/97	Pullorum	Fiocruz	São Paulo / 1997	
21	SP SP 1 - IOC 332/01	Pullorum	Fiocruz	Santa Catarina / 2001	
22	SC SG 1137/11-14	Gallinarum	LANAGRO	Rio Grande do Sul / 2001	Órgãos de galinhas
24	SP 21	Pullorum	FCAV/Unesp		
25	SG HAKIM 2X	Gallinarum	FCAV/Unesp		
26	LEBANM SG 36 - IOC 2003/01	Gallinarum	Fiocruz	Mato Grosso / 2001	
27	MT SG 372 GREEK	Gallinarum	FCAV/Unesp		
28	SG 7285-b	Gallinarum	FCAV/Unesp		
29	SG 292/90	Gallinarum	FCAV/Unesp		
30	SG 293/90	Gallinarum	FCAV/Unesp		
31	SG 291/90	Gallinarum	FCAV/Unesp		
33	SG 72-805 NANABI	Gallinarum	FCAV/Unesp		
35	SP 449/87 Nal	Pullorum	FCAV/Unesp	Reino Unido / 1987*	Aves com pulorose

37	SG 5441-b	Gallinarum	FCAV/Unesp		
38	SG 297/91	Gallinarum	FCAV/Unesp		
39	SG 32 - IOC 3554/99 RS	Gallinarum	Fiocruz	Rio Grande do Sul / 1999	
40	SP 6 - IOC 1783/96 SP	Pullorum	Fiocruz	São Paulo / 1996	
41	SG 10	Gallinarum	LANAGRO	-	
42	SP 5 - IOC 1775/96 SP	Pullorum	Fiocruz	São Paulo / 1996	
43	SP 2 - IOC 1776/96 SP	Pullorum	Fiocruz	São Paulo / 1996	
44	SG - SB1 (1811)	Gallinarum	IB** - Bastos	São Paulo / 2011	Órgãos de galinhas vermelhas em fase de produção
45	SG - SB2 (1911)	Gallinarum	IB** - Bastos	São Paulo / 2012	Órgãos de galinhas vermelhas com 81 dias
46	SG - SB3 (0412)	Gallinarum	IB** - Bastos	São Paulo / 2012	Órgãos de galinhas brancas com 70 semanas

* Berchieri et al. (2001).

** Instituto Biológico.

4.4. Cultivo e armazenamento das amostras

As amostras dos biovares Gallinarum e Pullorum chegaram ao laboratório liofilizadas ou cultivadas em ágar nutriente. Com o auxílio de alça bacteriológica estéril, o conteúdo de cada recipiente foi tocado e transferido para 10 mL de caldo lisogenia (LB) (Difco™ LB Broth Lennox, Sparks, Nevada, US) e incubado à 37°C por 24 h, sob agitação constante. No dia seguinte, a cultura bacteriana foi semeada em placas de Petri contendo ágar verde brilhante (VB) (Oxoid, Basingstoke, UK), as quais foram incubadas a 37°C por 24 h. A partir do ágar VB, uma colônia foi tocada e semeada em placa contendo ágar LB (Difco™ LB Agar Lennox, Sparks, Nevada, US) que, em seguida, foi incubada a 37°C por 24 h. Posteriormente, realizou-se a sorologia (ELLIS et al., 1976) e os testes bioquímicos das amostras bacterianas (EDWARDS; EWING, 1986). Dentre os testes bioquímicos, utilizou-se meios para avaliar a capacidade de fermentação do dulcitol, descarboxilação da ornitina, produção de H₂S, fermentação de sacarose e de glicose no ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e produção de H₂S e descarboxilação de lisina no ágar lisina ferro (LIA). Após confirmação, a cultura bacteriana sobre o ágar LB foi colhida e transferida a criotubos contendo um mililitro de caldo LB suplementado em 30% com glicerol. Os criotubos foram armazenados a -80°C.

4.5. Testes Bioquímicos

Para avaliar o comportamento das estirpes quanto à fermentação do dulcitol e descarboxilação da ornitina, utilizou-se o caldo base vermelho de fenol (Himedia, Mumbai, IN) e o caldo base de Moeller (Himedia, Mumbai, IN), respectivamente. A proporção de dulcitol (Merck, Nova Jersey, US) e cloridrato de L-Ornitina (Nuclear, São Paulo, BR) foram de 0,5% e 1%. O meio para descarboxilação de ornitina foi preparado em duplicata, sendo um o controle positivo (meio com a ornitina) e outro o negativo (meio sem a ornitina). Um “pool” de colônias do ágar LB foi inoculado no meio para fermentação de dulcitol e descarboxilação da ornitina, separadamente. Em seguida, adicionou-se em torno de 500 µL de vaselina pela parede dos tubos que continham o caldo de Moeller. Todos os tubos foram fechados e incubados a 37°C e os resultados interpretados após 24 h. O tempo de incubação dos meios contendo caldo de Moeller foi estendido por até 96 horas com monitoramento a cada 24 h para detecção de reação positiva tardia. Paralelamente, uma colônia do ágar LB foi inoculada nos meios semissólidos inclinados, TSI – Triplo Açúcar Ferro (Oxoid, Basingstoke, UK) e LIA – Ágar Lisina Ferro (Oxoid, Basingstoke, UK) perfurando o ágar até próximo do fundo e, em seguida, estriando a sua superfície. Os tubos foram incubados à 37°C por 24 h antes da interpretação dos resultados.

4.6. Sorologia

A sorologia foi realizada em duas etapas. Na primeira, as amostras eram testadas com antissoros polivalentes contra os antígenos somáticos (O) (Poli O – Probac, São Paulo, BR – código SOSAS) e contra os antígenos flagelares (H) (Poli H – Probac, São Paulo, BR – código SOSAF) de *Salmonella* spp. Um “pool” de colônias, obtidas por meio de alça de sementeira, foi homogeneizado em duas gotas separadas de 10 µL de solução salina 0,85% dispostas sobre uma lâmina de microscopia. Após a homogeneização adicionou-se 10 µL de antissoro polivalente

somático em uma delas e polivalente flagelar na outra; seguiu-se a uma rápida homogeneização. A lâmina foi suavemente agitada em movimento circular, por aproximadamente dois minutos para verificação da formação do complexo antígeno-anticorpo. Na segunda etapa, as amostras positivas para o antissoro poli O e negativas para o poli H eram testadas, seguindo-se o mesmo procedimento descrito acima, com o antissoro monovalente contra o antígeno somático O:9 (Bio-Rad, Califórnia, US – código 59101).

4.7. Extração de DNA

Para a extração do DNA cromossômico bacteriano, preparou-se uma cultura em 10 mL de caldo LB para cada amostra que havia sido armazenada a - 80°C. Após a inoculação, o caldo foi incubado sob constante agitação a 37°C por 24 h. O DNA foi extraído usando-se o “kit” para extração de DNA genômico QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE) segundo as instruções do fabricante, descritas a seguir. A cultura foi centrifugada a 5.000 x g (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R) por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuscitado no caldo LB remanescente, o qual foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. A esse microtubo, acrescentou-se o tampão ATL até completar um volume final próximo de 180 µL. Em seguida, adicionou-se 20 µL de proteinase K, homogeneizou-se o conteúdo por agitação mecânica (“vortex mixed”) e a amostra foi então incubada em banho-seco (modelo BS30) por 1 h a 56°C; o conteúdo foi homogeneizado de duas a três vezes durante este período. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (Centrífuga MiniSpin® plus – Eppendorf) por aproximadamente 5 s no modo “short spin”. Adicionou-se, então, 4 µL de RNase e, após homogeneização, incubou-se a amostra a 70°C por 10 min. Procedeu-se a nova centrifugação, adicionou-se ao microtubo 200 µL de etanol absoluto seguido de homogeneização e nova centrifugação. O conteúdo do microtubo foi totalmente transferido para a coluna de purificação do “kit” de extração e centrifugado à 4.300 x g durante 1 min. Após a passagem de todo o conteúdo líquido, a coluna foi transferida para um novo

microtubo de 2 mL fornecido no “kit”. Adicionou-se 500 µL de tampão AW1 e centrifugou-se a 4.300 x g por 1 min. Novamente, transferiu-se a coluna para um novo microtubo de 2 mL (não fornecido), adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 12.000 x g durante 3 min. Para eliminar os resíduos do tampão AW2, a coluna foi novamente transferida para um outro microtubo de 2 mL e centrifugada a 12.000 x g por 1 min. Terminado este procedimento, a coluna de extração de DNA foi transferida para um microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de tampão AE seguindo-se uma incubação de 5 min em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 6.000 x g durante 1 min e, desta vez, a coluna foi descartada e o DNA presente na solução foi quantificado, fracionado e estocado à -20°C. A análise do DNA extraído foi feita no aparelho NanoDrop® 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, US) de acordo com Sambrook e Russel (2001), observando-se a sua concentração, em ng/µL, e a qualidade através das razões de absorbância 260/280 e 260/230.

4.8. Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A padronização baseou-se nos parâmetros recomendados por Grunenwald (2003) com algumas modificações. As estirpes SG287/91 de *S. Gallinarum* e SP449/87 de *S. Pullorum* foram utilizadas como padrões positivos. Para estabelecer a temperatura ótima de pareamento para cada par de iniciadores, realizou-se uma PCR com gradiente de temperatura variando de 55 a 67°C em um termociclador (MJ Research - PTC-200). Em seguida, a concentração de cada reagente da PCR foi individualmente padronizada até que fosse gerada somente uma banda, bem visível e sem amplificações inespecíficas. Na Tabela 3 encontra-se a lista de reagentes e concentrações empregadas.

Tabela 3. Concentração dos reagentes de PCR usados neste estudo.

Reagentes	Concentração	
	Inicial (GRUNENWALD, 2003)	Reação padronizada
Água Ultrapura	Volume para 25 µL	Volume para 25 µL
10x Tampão PCR	1x tampão de PCR	1x tampão de PCR
Dinucleotídeos trifosfato (dNTP)	160 µM	160 µM
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂)	5 mM	1,5 mM
Iniciadores	1 µM (de cada um)	0,6 µM (cada)
Taq DNA polimerase	1,25 U	0,75 U
DNA molde (no mínimo 10 ng/µL)	1 µL	1 µL

4.9. Análise da conservação das RODs nos isolados de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler – Bio-Rad) e os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 4. A temperatura de pareamento de 65°C se mostrou ótima para amplificar os produtos de todos pares de iniciadores, e por isso foi adotada. Após a amplificação, realizou-se a eletroforese a 4 V/cm em gel de agarose 1,5% (peso/volume) corado com brometo de etídio (Invitrogen Corporation, Califórnia, US). A imagem dos “amplicons” foi obtida no fotodocumentador Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad, EUA) e analisadas no programa Image Lab versão 4.0.1.

Tabela 4. Parâmetros utilizados na PCR.

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1°	94°C	3 min	1 vez
	94°C	1 min	
2°	65°C	30 s	25 vezes
	72°C	Variação*	
3°	72°C	5 min	1 vez
4°	4°C	∞	-

* Tempo de extensão variou de acordo com o tamanho do fragmento esperado segundo parâmetro de extensão da Taq DNA polimerase de 1000 pb/min.

4.10. Purificação de produtos da PCR

Os “amplicons” gerados para uma determinada ROD, na estirpe padrão, foram purificados para sequenciamento. A purificação foi feita por meio do “Silica Bead DNA Gel Extraction Kit” (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) conforme a orientação do fabricante. Duzentos microlitros de produto de PCR foram reunidos em microtubos de 1,5 mL. Adicionou-se a esse microtubo 600 µL de “Binding Buffer” e, após suave agitação por inversão, o material foi incubado em banho seco (modelo BS30) a 55° por 5 min. Posteriormente, adicionou-se a cada amostra 5 µL de “Silica Powder Suspension”. A solução foi homogeneizada por agitação mecânica e incubada novamente a 55°C por 10 min. Passados os primeiros 5 min, realizou-se nova homogeneização para ressuspensão da sílica sedimentada. Ao final dos 10 min, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 s (MiniSpin® plus - Eppendorf). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se a amostra 500 µL de “Washing Buffer”. O sedimento foi ressuspendido através de agitação mecânica, o tubo centrifugado a 12.000 x g por 5 s e o sobrenadante descartado. Essa etapa de lavagem foi repetida três vezes. Após o último descarte do sobrenadante, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 s para remoção do sobrenadante remanescente. Após permanecer por uma hora em temperatura ambiente, para secagem, o sedimento foi ressuspendido em 6 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, Missouri, US). Em seguida, após ser mantido em banho seco a 55°C durante 5 min, foi centrifugado a 12.000 x g por 5 s, quando então, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um microtubo de 200 µL. Adicionou-se mais 6 µL de água ultrapura, centrifugou-se a 12.000 x g durante 30 s e transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo de 200 µL devidamente identificado. O material, congelado, foi encaminhado, juntamente com os iniciadores direto e reverso (Tabela 1), ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) localizado na FCAV/Unesp para sequenciamento.

4.11. Sequenciamento das amostras

As amostras contendo os amplicons foram processadas e submetidas ao sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, US) segundo instruções do fabricante. Foram sequenciados os produtos dos iniciadores direto e reverso de cada ROD. A fita “consensus” foi gerada por meio do programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (HALL, 1999) e a análise de similaridade feita na plataforma “on-line” BLAST (BLASTn) (ALTSCHUL et al., 1990).

4.12. Análise de Agrupamento Hierárquico do padrão de bandas da PCR

O padrão de bandas das RODs para as estirpes testadas foi analisado levando-se em conta a presença (1), ausência (0) ou a variação no tamanho dos “amplicons”. Os dados foram distribuídos na tabela e submetidos ao programa “R” (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2010) para análise de agrupamento hierárquico. A estratégia de agrupamento foi pelo método de Ward, utilizando-se o coeficiente de Jaccard. Ao final da análise gerou-se um dendrograma com base nos perfil de bandas nos isolados (SNEATH; SOKAL, 1973).

5. RESULTADOS

5.1. Confirmação microbiológica das estirpes analisadas

Os testes bioquímicos e sorológicos, demonstrados na Tabela 5, asseguraram a identificação das 25 estirpes de *S. Gallinarum* e 16 de *S. Pullorum* cedidas e previamente identificadas pelos Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e da estirpe 35 (SP449/87 Nal) cedida pela “School of Veterinary Medicine and Science” da “University of Nottingham” no Reino Unido. Algumas das estirpes testadas apresentaram comportamento bioquímico atípico. Quatro estirpes do biovar Pullorum (estirpes 1, 3, 11 e 12) apresentaram resultado negativo na prova de descarboxilação da ornitina e uma do biovar Gallinarum (estirpe 6) apresentou resultado negativo na prova para fermentação do dulcitol. Os resultados dos testes sorológicos foram os esperados para os biovares Gallinarum e Pullorum.

Tabela 5. Comportamento bioquímico e sorológico das estirpes analisadas.

Estirpe	Testes bioquímicos				Sorologia			Biovar
	Dulcitol	Ornitina	TSI	LIA	Poli O	Poli H	O:9	
1	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum*
2	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
3	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum*
4	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
5	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
6	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum*
7	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
8	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
9	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
10	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
11	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum*
12	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum*
13	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
14	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
15	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
16	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
17	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
18	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
19	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
20	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
21	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
22	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum

24	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
25	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
26	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
27	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
28	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
29	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
30	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
31	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
33	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
35	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
37	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
38	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
39	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
40	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
41	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
42	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
43	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pullorum
44	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
45	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum
46	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Gallinarum

* Estirpe com comportamento bioquímico atípico (Estirpe 6: não houve fermentação do dulcitol após 24 horas de incubação; Estirpes 1, 3, 11 e 12: não houve descarboxilação da ornitina até 96 horas de incubação).

5.2. Análises comparativas entre *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*

Os três genomas se mostraram colineares, exceto por duas inversões na estirpe SP RKS5078, em relação à SG287/91. As inversões ocorreram em *loci* de RNA 23S e 16S do ribossomo (rRNA), invertendo um fragmento compreendido do gene *yafB* ao *kgtP* (SPUL_r002 e SPUL_r005) e outro do *purH* ao *yieP* (SPUL_r010 e SPUL_r016). Observou-se acúmulo de vários “pseudogenes” nos genomas de SP449/87 e SP RKS5078 em comparação ao de *S. Enteritidis* PT4. Tais “pseudogenes” foram formados principalmente por substituições “nonsense” e inserções / deleções (“Indels”) que geraram “frameshifts” ou possivelmente levam a codificação de proteínas truncadas. A comparação permitiu a identificação de 68 RODs (Tabela 1A e Figuras 1 e 2) e de “pseudogenes” que se dividiram em combinações que foram desde comuns aos três genomas até específicos a um deles (Tabela 6). As RODs encontradas continham genes relacionados a funções celulares, tais como reparo do DNA e desagregação de proteínas, metabolismo e virulência. Além disso, foram identificados genes polimórficos, mas putativamente

funcionais e outros ausentes em um ou outro biovar, totalizando 106 *loci* alterados. A distribuição de genes alterados está ilustrada na Figura 3.

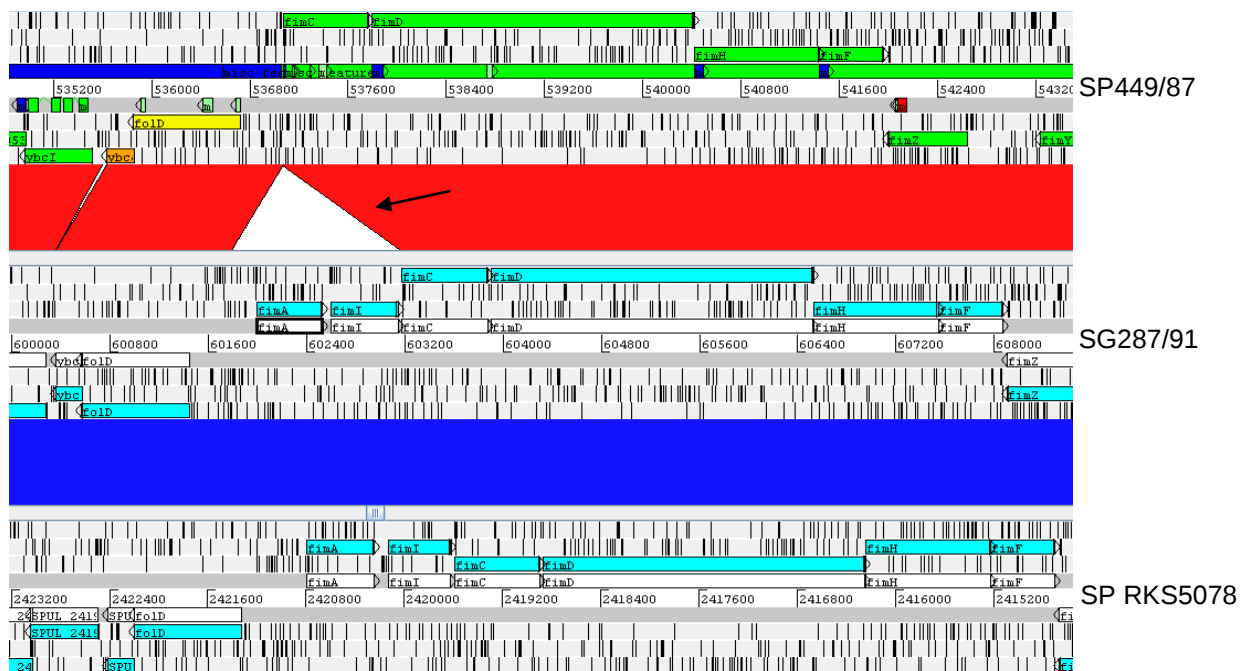


Figura 1. Demonstração da ROD6 no programa ACT (seta preta). ROD não conservada formada por deleção dos ortólogos de *fimA* e *fimI* somente no genoma de SP449/87. A ausência de conservação nessa ROD foi comprovada por PCR (Figura B5).

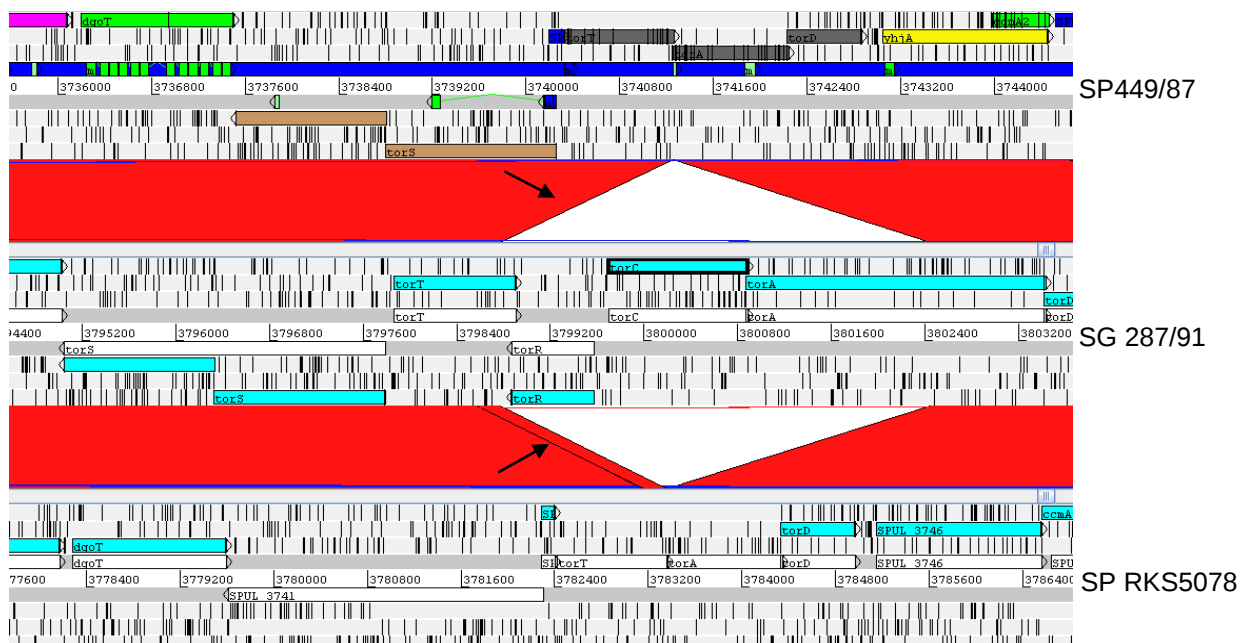


Figura 2. Demonstração da ROD37 no programa ACT (setas pretas). ROD formada por deleção dos ortólogos de *torR* e *torC* em SP449/87 e SP RKS5078. Os

genes *torT* e *torA* são remanescentes nos genomas de *S. Pullorum*. Essa ROD foi conservada tanto à comparação dos genomas quanto por PCR (Figura B31).

De modo geral, os *loci* analisados possuíam sequências de nucleotídeos similares as dos seus ortólogos em *S. Enteritidis* PT4. Quando não demonstravam 100% de homologia, apresentavam polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) ou polimorfismo de tamanho. Alguns dos “pseudogenes” demonstraram estar no mesmo estado de degradação em SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078, enquanto outros se mostraram diferentes, mesmo entre os genomas de *S. Pullorum*.

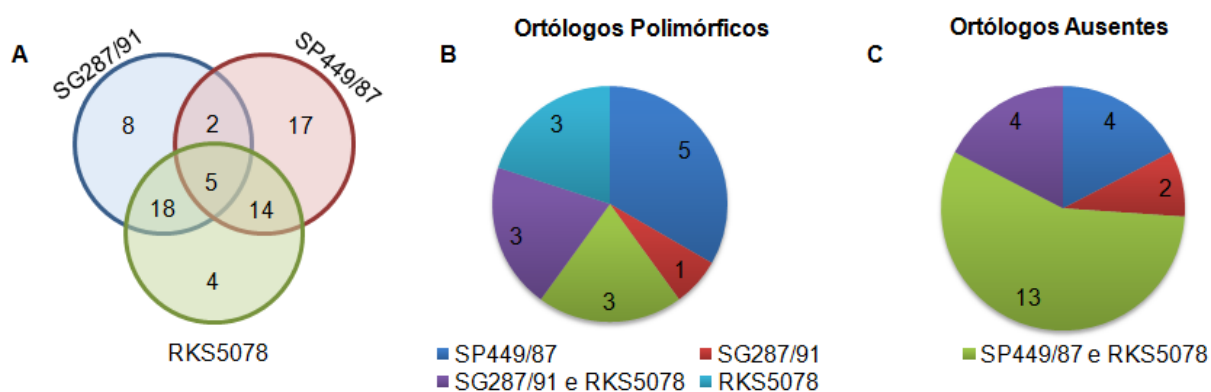


Figura 3. Distribuição de *loci* afetados contidos nas RODs identificadas entre SG287/91, SP449/87 e RKS5078. (A) O diagrama de Venn mostra o número de “pseudogenes” único ou compartilhado entre elas; (B) distribuição de *loci* com polimorfismos de tamanho (sem putativa perda de função); (C) quantidade de ortólogos que não foram identificados em um ou mais genomas.

Em ambos os genomas de *S. Pullorum* utilizados nesse estudo foram identificadas 15 ilhas de patogenicidade (SPIs), a ilhota (“islet”) CS54 e “operons” fimbriais; 13 em SP449/87 e 12 em SP RKS5078 (Tabela 2A). Essa identificação se baseou em homologia de sequências com aquelas previamente mapeadas nos genomas de *S. Enteritidis* PT4 e SG287/91. O conteúdo de quase todas as SPIs se assemelhou àqueles encontrados em *S. Enteritidis* PT4, com algumas exceções. Por exemplo, as SPI-2, SPI-3, SPI-9, SPI-10, SPI-12 e SPI-17 apresentaram acúmulo de

“pseudogenes” enquanto que a SPI-11 esteve parcialmente presente em ambos os biovares devido a uma grande deleção. A SPI-6 possuía aproximadamente 43 kb em SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078, possuindo conteúdo genético diferente daquela encontrada em *S. Enteritidis* PT4, a qual é aproximadamente 30 kb menor. Mesmo entre biovares, existe diferença no conteúdo gênico da SPI-6, como por exemplo, o “operon” fimbrial *saf* que está presente em SP449/87 e SP RKS5078 não possuía ortólogos na SPI-6 de SG287/91. A SPI-12 foi localizada em SG287/91, SP RKS5078 e SP449/87. No entanto, o “operon” *ccm* associado a essa ilha de patogenicidade apresentou “pseudogenes” em *ccmHA* em SP RKS5078 e está completamente ausente em SP449/87. Esse “operon” possui um parálogo em SG287/91 e em *S. Enteritidis* PT4 situada a “downstream” do “operon” *tor*. Porém, esses parálogos em SP449/87 e SP RKS5078 contém acúmulo de “pseudogenes”.

Análises *in silico* dos “operons” fimbriais de *S. Pullorum* demonstraram que em SP449/87, aparentemente, apenas três deles seriam possivelmente funcionais (*saf*, *csg* e *std*). Nos outros 10 existem “frameshifts” ou substituição “nonsense” em seus genes. Em SP RKS5078 os “operons” *bcf*, *saf*, *fim*, *csg* e *ste* seriam aparentemente funcionais e os ortólogos do “operon” *std* não estavam presentes. As análises das SPIs e dos “operons” fimbriais estão na Tabela 2A.

Tabela 6. “Pseudogenes” compartilhados entre SG287/91 e SP449/87 e/ou SP RKS5078.

Classe*	Loci em SG287/91	Loci em SP449/87	Loci em SP RKS5078	Gene	Produto de gene
II	SG0368	(f)	SPUL_2615	<i>mod</i>	Enzima do sistema de restrição/modificação to tipo III (StyLTI) – restrição, modificação e reparo do DNA
II	SG0399	(f)	SPUL_2584	<i>yail</i>	Proteína hipotética conservada
II	SG1010	(f)	SPUL_1936	<i>ycdC</i>	Regulador putativo de transcrição
II	SG1273	(f)	SPUL_1660	-	Proteína putativa transportadora de membrana
II	SG1540/1542	(f)	SPUL_1397/1396	-	Proteína ligante de STP e lipoproteína
II	SG1573 – SG1577	(f)	SPUL_1362 – SPUL_1360	-	Proteína hipotética (PqaA) regulada pelo sistema <i>phoPQ</i> , transportador de membrana
III	SG1573	SPUL16151	SPUL_1363	-	Antiportador putativo de Na ⁺ /H ⁺
II	SG1621	(f)	SPUL_1315	<i>dmsA1</i>	Codifica subunidade A da enzima dimetilssulfoxido redutase (usada em anaerobiose)
II	SG1841	(f)	SPUL_1090	<i>yeaJ</i>	Proteína putativa de membrana
II	SG1985	(f)	SPUL_0936	<i>ycdY</i>	Proteína hipotética conservada
II	SG1986	(f)	SPUL_0935	<i>ycdX</i>	Putativa hidrolase
III	SG2096	SPUL21821	SPUL_0833	<i>sopA</i>	Proteína efetora secretada pelo SSTT-1
III	SG2268	SPUL23631	SPUL_0654	<i>sspH2</i>	Proteína efetora secretada pelo SSTT-2
III	SG2698	SPUL28041	SPUL_2786	<i>gabT</i>	4-aminobutyrate aminotransferase
III	SG3403	SPUL35641	SPUL_3650	<i>yihT</i>	Putativa aldolase
II	SG3491	(f)	SPUL_3472	<i>rhtB</i>	Proteína para efluxo de homoserina/ homoserina lactona
I	SG3959	SPUL41521	(f)	<i>bigA</i>	Proteína putativa de virulência exposta na superfície celular (BigA)
II	SG4058	(f)	SPUL_4204	-	Proteína de membrana putativa
III	SG4150	SPUL43501	SPUL_4297	<i>dmsA2</i>	Codifica subunidade A da enzima dimetilssulfoxido redutase

* I – “pseudogene” em SG287/91 e SP449/87; II – em SG287/91 e SP RKS5078; III – em SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078.

(f) – putativamente funcional.

5.3. Análise das RODs por PCR e agrupamento das estirpes

As RODs que foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) constam na Tabela 7, sendo que as 25 estirpes de *S. Gallinarum* e 17 de *S. Pullorum* foram agrupadas levando-se em conta o perfil de presença (1) e ausência (0) ou polimorfismo nos “amplicons”. O coeficiente cofenético, que mede a consistência do padrão de agrupamento, foi de 0,89.

Foi possível separar as estirpes de *S. Pullorum* em dois subgrupos e as estirpes de *S. Gallinarum* em três (Figura 4). Em ambos os biovares, a estirpe-padrão se encaixou nos subgrupos menores. As estirpes SG_Str. 33 e SG_Str. 26 apresentaram perfis particulares segundo análise do dendrograma da Figura 4. As ROD8 e ROD33 apresentaram padrão de bandas que não eram o de presença e ausência e, por isso, foram analisadas separadamente (figuras 3 e 4). As demais imagens da PCR geradas e utilizadas na análise estatística estão dispostas no Apêndice B (figuras B1 a B32).

As RODs 1, 4, 7, 12, 13, 14, 15, 21, 27, 30, 36, 37 e 43 se mostraram conservadas nas estirpes testadas. As RODs 5, 11, 18, 19, 20, 23 e 24 não estavam conservadas apenas na estirpe 33. O padrão genético dessa estirpe nas RODs ora a classificava como *S. Gallinarum* ora como *S. Pullorum*. As RODs 2, 6, 8, 9, 16, 17, 22, 32, 33, 34, 39 não se mostraram conservadas nas estirpes testadas (Tabela 7).

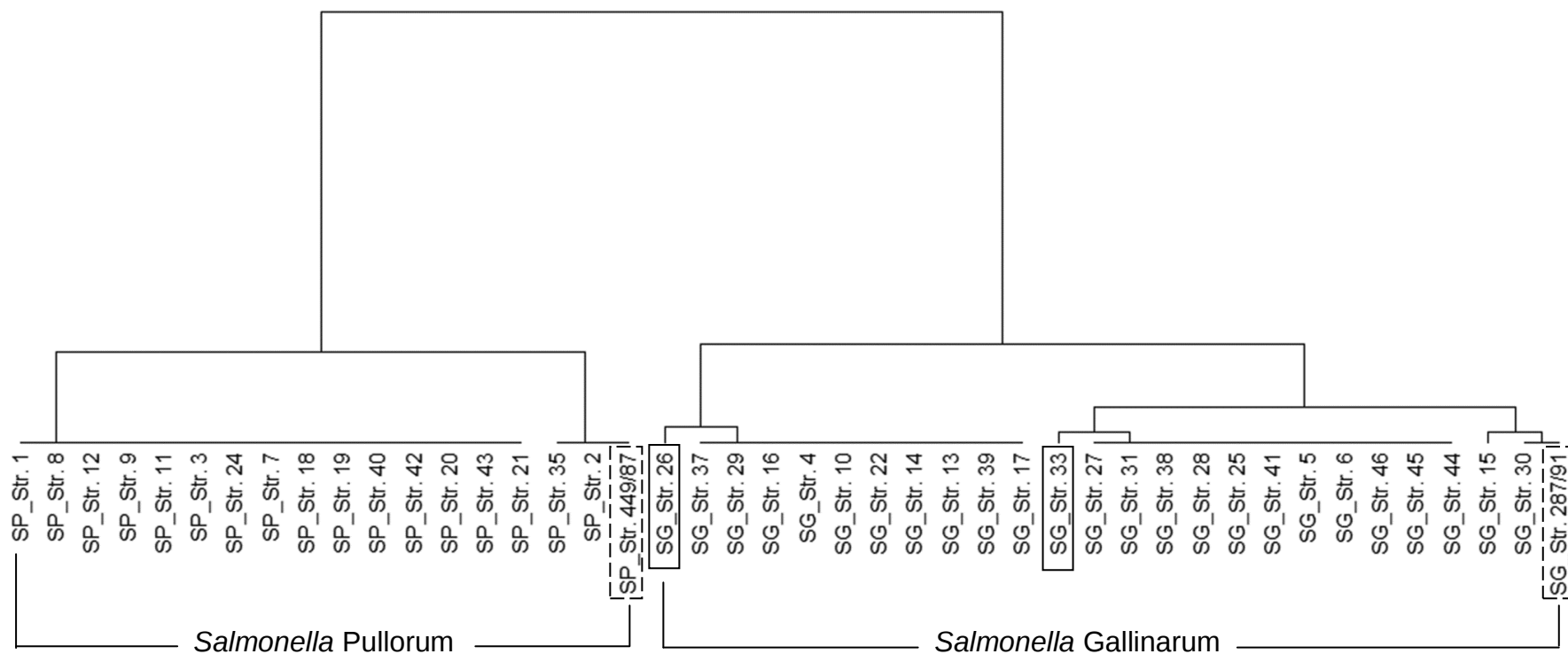


Figura 4. Dendrograma agrupando as estirpes de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* com base no perfil de bandas em cada ROD. Quadrados fechados destacam as estirpes 26 e 33 do biovar *Gallinarum* com perfis únicos e quadrados pontilhados as estirpes-padrão.

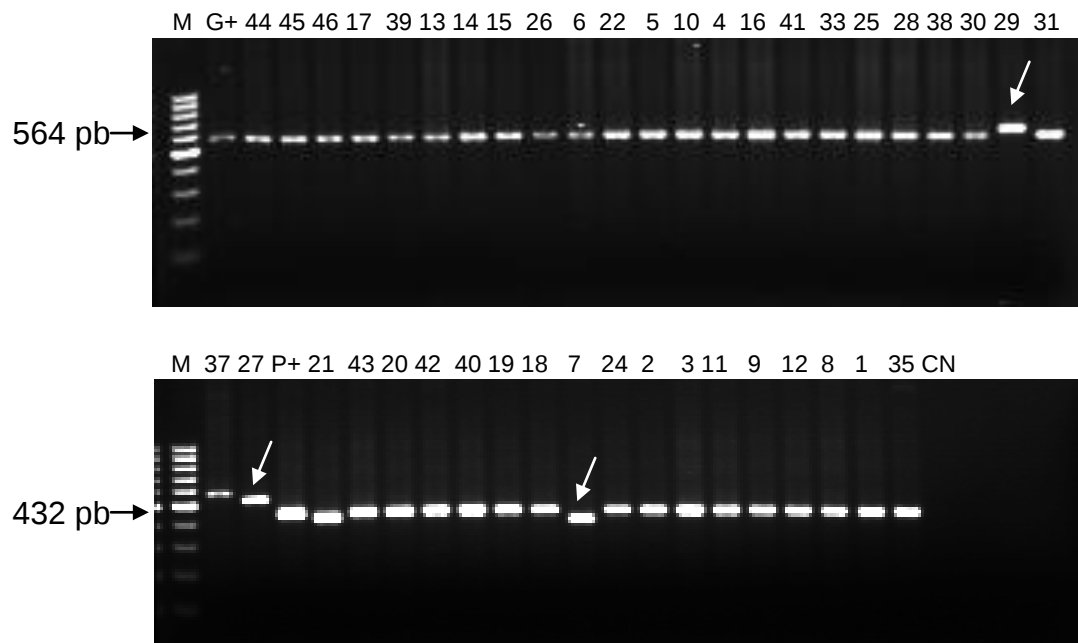


Figura 5. Eletroforograma em agarose 1,5% da ROD8 (gene *tolA*). Gene possivelmente alvo de formação de “pseudogene”. M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Fermentas, US). G+: Controle positivo de *S. Gallinarum* (SG287/91). P+: Controle positivo *S. Pullorum* (SP449/87). CN: Controle negativo. Números arábicos: estirpes testadas. Setas brancas: “amplicons” com tamanho molecular fora do esperado.

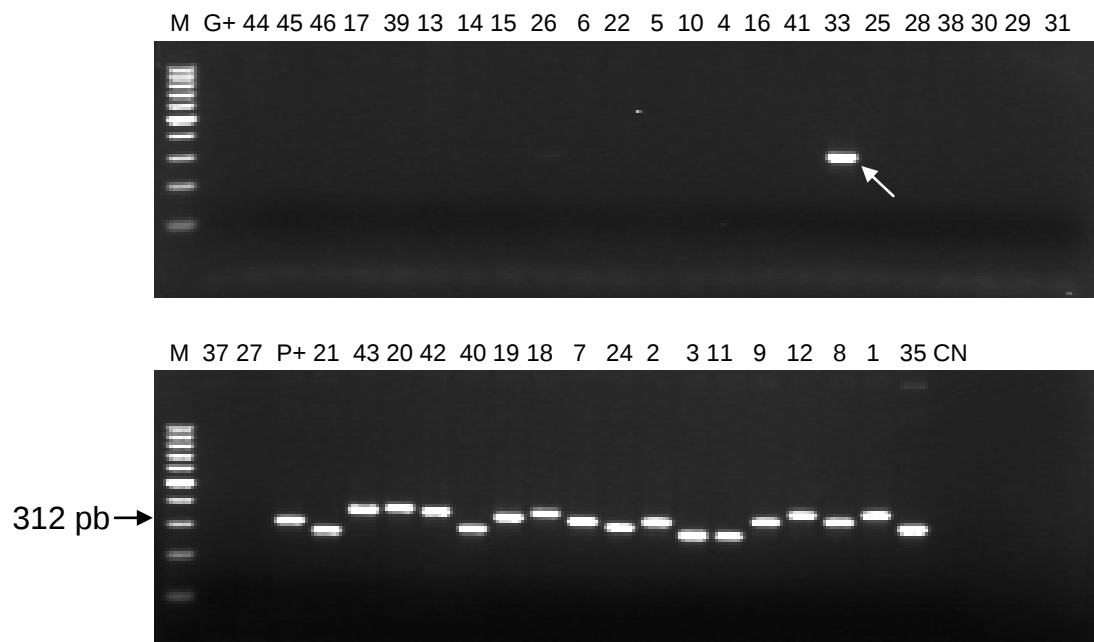


Figura 6. Eletroforograma em agarose 1,5% da ROD33 (homologia com o gene *rcnA*). Região de formação de “pseudogene”. M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Fermentas, US). G+: Controle positivo de *S. Gallinarum* (SG287/91). P+: Controle positivo *S. Pullorum* (SP449/87). CN: Controle negativo. Números arábicos: estirpes testadas. Seta branca: “Amplicon” esperado no biovar *Pullorum* presente em estirpe do biovar *Gallinarum*.

O sequenciamento dos “amplicons” comprovou que a amplificação ocorreu na região genômica esperada.

Tabela 7. RODs verificadas por PCR e sua conservação nas estirpes utilizadas.

ROD	Genoma de referência*	Genes/loci envolvidos	Função predita**	Conservação
1	SG287/91	<i>citE2</i>	Subunidade β da enzima citrato liase – metabolismo do citrato	Sim
2	SG287/91	<i>stfA</i> e <i>stfC</i>	Genes do “operon” fimbrial <i>stf</i> . Subunidade principal da fímbria e proteína de membrana externa (<i>usher protein</i>) para montagem da fímbria	Não
4	SG287/91	<i>res</i>	Subunidade de restrição do sistema de modificação e restrição do tipo III – StyLTI	Sim
5	SP449/87	<i>yail</i>	Proteína hipotética conservada – domínio pertencente a superfamília DUF188	Sim***
6	SG287/91	<i>fimA</i> e <i>fimI</i>	Genes do “operon” fimbrial <i>fim</i> . Proteína fimbrial do tipo 1 (precursor) e proteína principal da fímbria	Não
7	SG287/91	<i>ybgL</i>	Proteína hipotética conservada. Domínio conservado da superfamília LamB_YcsF (utilização de lactâmicos)	Sim
8	SG287/91	<i>tolA</i>	Proteína envolvida em processos celulares e patogenicidade	Não
9	SG287/91	<i>yliD</i>	Permease transportadora do tipo ABC. Homologia 100% com gene <i>gsiD</i> envolvido no transporte de glutatona	Não
11	SP449/87	<i>ycdC</i>	Regulador de transcrição da família TetR/AcrR (rRegulador RtuR)	Sim***
12	SG287/91	SG1034	Putativa ATPase <i>clpB</i> . Desagregação de proteínas celulares, recuperação celular e termotolerância. Relacionado ao um sistema de secreção do tipo VI	Sim
13	SP449/87	SPUL13101	Transportador de múltiplas drogas homólogo aquelas da família MFS (Major Facilitator Family). Similaridade com o transportador EmrB que confere resistência bacteriana a fármacos	Sim
14	SG287/91	SG1441-SG1453	Oxirredutase da superfamília SDR (Short-chain Dehydrogenase/Reductase); lipoproteína; invasina; proteína ligante de DNA; proteína reguladora	Sim
15	SG287/91	SG1517	Transportador de benzoato da superfamília benE. Simporter benzoato / hidrogênio	Sim
16	SG287/91	<i>ydcW</i> , <i>ydcX</i> e <i>srfC</i>	Gama aminobutiraldeído desidrogenase; proteína hipotética de membrana interna; proteína efetora	Não
17	SG287/91	<i>srfA</i> , <i>ydcY</i> e <i>ydcZ</i>	Proteína efetora; proteína hipotética; proteína de membrana interna	Não
18	SP449/87	SPUL15811-SPUL15821	Associado ao catabolismo de alcoóis; lipoproteína	Sim***
19	SP449/87	SPUL16221	Efluxo de drogas	Sim***
20	SP449/87	<i>pqaA</i>	Gene de virulência regulado pelo sistema PhoPQ	Sim***
21	SP449/87	<i>dmsA1</i>	Subunidade a da enzima dimetilsulfóxido redutase. Metabolismo de DMSO	Sim
22	SP449/87	<i>mdtI</i> e <i>mdtJ</i>	Sistema de efluxo para resistência a múltiplas drogas (espermidina)	Não

23	SP449/87	<i>SPUL19031-SPUL19061</i>	Proteína de membrana externa (MipA); proteína serina kinase (PrkA); proteínas hipotéticas	Sim***
24	SP449/87	<i>ycdY e ycdX</i>	Codificam proteínas reguladora e relacionada ao reparo do DNA	Sim***
27	SG287/91	<i>yeiU</i>	Proteína putativa transmembrana	Sim
30	SG287/91	<i>ratA</i>	Proteína putativa de membrana externa	Sim
32	SG287/91	<i>SG2814,15 e 16</i>	Permease putativa família MFS; regulador e transportador	Não
33	SP449/87	<i>SPUL30501-SPUL30641</i>	“Operon” fimbrial <i>std</i> ; resistência a metais de transição e a drogas	Não
34	SG287/91	<i>glpKX</i>	Metabolismo do glicerol	Não
36	SP449/87	<i>SPUL36161</i>	Homologia a gene que codifica proteína do sistema de secreção do tipo III (NleB)	Sim
37	SG287/91	<i>torTRCA</i>	Genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo de TMAO	Sim
39	SG287/91	<i>ccmF</i>	Maturação do citocromo C	Não
43	SG287/91	<i>idnTO</i>	Metabolismo do gluconato	Sim

* Genoma onde ou gene/*locus* está intacto.

** Função predita na anotação do genoma ou por homologia da sequência de aminoácidos no BLASTp.

*** RODs na qual a estirpe SG 33 se comportou com SP.

6. DISCUSSÃO

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovars Gallinarum e Pullorum são dois micro-organismos genética e fenotipicamente similares, porém são causadores de duas enfermidades distintas em aves, o tifo aviário e a pulorose, respectivamente (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). Essas doenças são consideradas sob controle nos países desenvolvidos, mas ainda são graves problemas naqueles em desenvolvimento, onde as medidas de controle em vigor não são aplicadas de forma eficiente e as condições climáticas favorecem a multiplicação bacteriana (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001). Ressalta-se, no entanto, a notificação de um surto de tifo aviário na Irlanda em 2012 (WORLD POULTRY, 2012).

Pouco se sabe sobre as bases genéticas responsáveis pelas diferenças na patogenicidade desses micro-organismos. Um plasmídio de virulência (*spv*) presente em ambos os biovars (BARROW et al., 1987; BARROW; LOVELL, 1988; CHRISTENSEN et al., 1992) foi apontado como essencial para o desenvolvimento das enfermidades, mas sozinho não foi capaz de tornar uma estirpe virulenta. Provavelmente, o potencial de virulência somente é atingido quando ocorrem interações entre genes do plasmídio de virulência e determinados genes de virulência cromossômicos (BARROW; LOVELL, 1989).

Análises genômicas comparativas realizadas entre sorovares da subespécie *enterica* têm gerado informações sobre a biologia bacteriana, os mecanismos de restrição ao hospedeiro e de adaptação a um novo nicho (do intestino para infecção sistêmica). Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar os genomas de *S. Gallinarum* 287/91 (SG287/91) e *S. Pullorum* 449/87 (SP449/87) para identificação e análise das regiões de diferença (RODs). O genoma da estirpe RKS5078 do biovar Pullorum (SP RKS5078) foi posteriormente adicionado à análise a fim de aumentar a confiabilidade do estudo, pois de acordo com Dobrindt e Hacker (2001) e Lawrence e Hendrickson (2005), um único genoma não representa integralmente o conteúdo genético de uma determinada espécie bacteriana.

Os genomas de SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078 são colineares embora haja duas inversões nesse último em relação ao primeiro. A colinearidade tem sido relatada entre alguns sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* (THOMSON et al., 2008; HOLT et al., 2009). Uma possível razão seria a recente divergência dos micro-organismos dessa subespécie, que é estimada em torno de quatro milhões de anos (MCQUISTON et al., 2008); tempo que pode ter sido insuficiente para permitir eventos de divergência gênica que modificassem radicalmente a composição e estrutura do genoma. Além disso, os micro-organismos desse gênero teriam divergido como linhagens clonais (REEVES et al., 1989; MCQUISTON et al., 2008) e, por isso, possuiriam conteúdo genético similar. Por fim, é possível que essa organização genética seja pré-requisito para que os micro-organismos da subespécie *enterica* sejam capazes de causar doença nos hospedeiros.

Durante a análise, observou-se elevado acúmulo de “pseudogenes” no genoma de SP449/87 em relação ao genoma de *S. Enteritidis* PT4. Resultado semelhante foi relatado por Feng et al. (2012) em SP RKS5078 que alberga 263 “pseudogenes” no seu genoma afetando cerca de 6% da capacidade de codificação de proteínas dessa bactéria. É possível que, assim como ocorreu com *S. Gallinarum*, *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A (PARKHILL et al., 2001; MCCLELLAND et al., 2004; THOMSON et al., 2008), *S. Pullorum* venha sofrendo um processo de “evolução por redução” do seu conteúdo genético. Esse fenômeno tem sido descrito em micro-organismos que se comportam como parasitas intracelulares (DOBRINDT; HACKER, 2001).

Nos membros do gênero *Salmonella* parece existir uma ligação entre o acúmulo de “pseudogenes”, a restrição da bactéria ao hospedeiro e a habilidade de causar doença sistêmica (THOMSON et al., 2008; HOLT et al., 2009; KINGSLEY et al., 2009). Uma estirpe de *S. Typhimurium* (ST313 D23580) foi identificada com características que a aproximava da restrição ao hospedeiro. A estirpe ST313, isolada na África subsaariana, ao contrário dos outros espécimes desse sorovar que causam uma gastroenterite autolimitante em humanos, é altamente invasiva, provoca bacteremia, meningite e poucos sinais de comprometimento intestinal. O sequenciamento dessa estirpe demonstrou alto número de SNPs, inserções e

deleções que levaram a formação de vários “pseudogenes” (KINGSLEY et al., 2009).

Não estão claras quais são as vantagens em abandonar um estilo de vida intestinal para se tornar parasita intracelular, visto que o micro-organismo se torna mais agressivo e frequentemente leva o hospedeiro à morte. Por outro lado, ao analisar a carcaça de animais que vieram a óbito após o tifo aviário, percebe-se que a bactéria é recuperada em grande quantidade nos tecidos. Considerando que *S. Gallinarum* não é eficiente na sua propagação via fecal ou transmissão vertical, essa poderia ser uma rota alternativa de transmissão.

Estudos realizados por Kidgell et al. (2002) e Eswarappa et al. (2009) demonstraram que esse processo de especialização em *Salmonella* spp. teria se iniciado a cerca de 50.000 anos. Durante essa época provavelmente ocorreu algum evento que tornou vantajosa a vida como parasitas intracelulares e a restrição a um hospedeiro. Foi proposto por Kidgell et al. (2009) e Feng et al. (2013) que nesse período, o homem teria adotado o sistema de comunidades e iniciado a domesticação dos animais. Talvez, o aumento na densidade populacional aumentou a disponibilidade de hospedeiro e, com isso, não havia necessidade de o patógeno infectar diferentes espécies para se manter viável na natureza.

Adaptação / restrição a um hospedeiro parece exigir algumas mudanças a fim de permitir a sobrevivência do micro-organismo no seu sistema. Os genes *ratA* e *bigA*, que codificam proteínas de superfície são polimórficos ou “pseudogenes” em *S. Pullorum*. Essas modificações provavelmente possibilitam que essa bactéria seja menos “visível” ao sistema imune das aves. Esse fato é também evidenciado pelo acúmulo de “pseudogenes” em genes fimbriais (Tabela A2). A presença de fímbrias em enterobactérias tem sido associada ao estímulo dos receptores do tipo “toll” de números 2 e 4 (TLR-2 e TLR-4) (FRENDÉUS et al., 2001; TÜKEL et al., 2005; ASHKAR et al., 2008). A escassez de estruturas fimbriais em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* pode ser justificada observando-se a forma de evolução desses biovars que passaram a realizar infecção sistêmica nas aves. Portanto, essa seria uma maneira de evadirem o sistema imune das aves, evitando a ativação dos receptores TLR-2 e TLR-4. Fato semelhante é observado quanto à ausência de flagelos em ambos os biovars (CHAPPELL et al., 2009; FREITAS NETO et al., 2013).

Quinze ilhas de patogenicidade foram identificadas em SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078, mas somente cinco delas possuem todos os seus genes homólogos aos encontrados em *S. Enteritidis* PT4. Os genes contidos nas SPIs têm a função de estabelecer relações específicas entre a bactéria e o seu hospedeiro, conferindo características de virulência ao micro-organismo (MARCUS et al., 2000). Perdas na função de alguns dos genes das SPIs provavelmente teriam pouco efeito sobre o potencial patogênico da bactéria, mas seriam uma maneira de modular as interações com hospedeiro (HOLT et al., 2009). Por exemplo, o gene *sopA* codifica uma proteína ligada à enteropatogenicidade e migração de polimorfonucleares (PMN) no epitélio intestinal (WOOD et al., 2000) é “pseudogene” em *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e em outros sorovares que causam doença sistêmica (PARKHILL et al., 2001; MCCLELLAND et al., 2004; THOMSON et al., 2008; HOLT et al., 2009). Possivelmente, sua inativação em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* favoreceria a invasão a partir do epitélio intestinal sem, contudo, afetar a patogenicidade.

Ao que tudo indica, em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* há uma tendência à perda de genes com funções de corrigir mutações, o que poderia favorecer o acúmulo de pseudogenes. De acordo com Feng et al. (2013), o gene *mutL*, que codifica uma proteína relacionada ao reparo do DNA, é “pseudogene” em *S. Pullorum*. No presente estudo também foi observado que o gene *ycdX*, com função relacionada a reparo de DNA, é “pseudogene” em SG287/91 e SP RKS5078 (TEPLYAKOV et al., 2003). Foi sugerido por Feng et al. (2013) que inativações não deletérias podem se acumular no genoma, levando a perda da estabilidade e, ao longo do tempo, levaria a bactéria a extinção. No entanto, de um ponto de vista de evolutivo, a maior taxa de mutação no genoma seria uma forma de acelerar a evolução bacteriana. Esse fenômeno foi anteriormente descrito em *S. Typhi* e *S. Paratyphi A* e pode ter contribuído para a adaptação destes micro-organismos ao ser humano (HOLT et al., 2009). Dessa forma, as características favoráveis geradas por essas mutações tenderiam a permanecer no biovar e tornariam a população subsequente mais adaptada que a anterior.

Ainda com relação à proteção do DNA bacteriano, a enzima codificada pelos genes *mod* e *res*, que possui funções de metilação do DNA bacteriano e restrição de material genético de profagos que entrem no citoplasma bacteriano, aparentemente

não é funcional em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. O DNA bacteriano ativa a resposta imune do hospedeiro por meio dos receptores TLR-9 nos mamíferos ou pelo seu homólogo nas aves, o TLR-21. No entanto, o tipo de resposta dependeria das condições de metilação desse genoma. Estímulos desencadeados por DNAs metilados direcionam a resposta imune para o tipo Th-1 (resposta imune celular) e os não metilados para o tipo Th-2 (resposta imune humoral) (VOLLMER et al., 2004). *S. Pullorum* permanece nos macrófagos durante o período de persistência no hospedeiro e modula a resposta imune para o tipo Th-2 (CHAPPELL et al., 2009). Portanto, a forma de ativação desse receptor pelo genoma de *S. Pullorum* poderia estar, de alguma forma, relacionado à persistência dessa bactéria nas aves.

Na comparação dos genomas de SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078, foi possível identificar RODs que se mantiveram conservadas nos dois genomas de *S. Pullorum*. É provável que as RODs não conservadas não sejam importantes para a patogenicidade dos microrganismos. Tais variações genotípicas em estirpes do mesmo biovar poderiam ser decorrentes das diferentes pressões de seleção a que foram submetidas. Dentre as RODs identificadas, talvez as mais relevantes tenham sido aquelas observadas no “operon” *ccm* de *S. Pullorum*. Esse “operon” está duplicado em SG287/91 e em *S. Enteritidis* PT4 (THOMSON et al., 2008), sendo, possivelmente, importante para o metabolismo desses micro-organismos. Em *E. coli* o “operon” *ccm* (*ccmABCDEFGH*) codifica proteínas que atuam na maturação do citocromo C. Nesse processo todos os genes *ccm* são essenciais (TANAPONGPIPAT et al., 1998). Existem pelo menos cinco tipos de citocromos C que estão envolvidos na produção de energia em anaerobiose; todos são sintetizados na presença de trimetilamina-N-óxido (TMAO) e nitrito/nitrato (Tanapongpipat et al., 1998). Uma vez que *S. Pullorum* possui deleções no *ccm*, é possível que a maturação do citocromo C não ocorra, pelo menos de modo eficiente nesse micro-organismo. Além disso, vias relacionadas que dependam desse citocromo poderiam estar prejudicadas em *S. Pullorum*.

Os genes *narZ*, *narX* e *nrIF* relacionados ao uso de nitrito/nitrato durante a respiração anaeróbica são “pseudogenes” em *S. Pullorum* (Tabela A1). Isso pode ser um indício de que as vias dependentes da maturação do citocromo C estão sendo afetadas. Talvez as mutações ocorridas no “operon” *ccm* tenham sido o

gatilho que desencadeou a inativação de outras rotas metabólicas. A perda dessas vias aparentemente intactas e funcionais em *S. Gallinarum* poderiam justificar, por exemplo, a menor taxa de multiplicação de *S. Pullorum* em meios de cultivo. *In vivo*, no entanto, essa diferença não é observada (BERCHIERI JUNIOR et al., 2001), possivelmente porque as defesas do hospedeiro também controlam a taxa de multiplicação bacteriana.

Em *S. Pullorum* não foi possível identificar os ortólogos dos genes *torRC* (ROD37) (Figura B31). A ausência desses genes em *S. Pullorum*, que estão associados à proteção bacteriana em pH elevado, já havia sido notificada por Porwollik et al. (2005). As proteínas codificadas por esses genes também estão envolvidas na utilização de trimetilamina-N-óxido (TMAO) como aceptor final de elétrons na respiração anaeróbica (ANSALDI et al., 2007). Em *E. coli*, o “operon” *tor* é expresso tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, provavelmente, servindo como via suplementar de produção de ATPs. A proteína TorC é dependente daquelas codificadas pelo “operon” *ccm*. É possível que a utilização de TMAO para produção de energia não seja uma opção em *S. Pullorum* e a deleção nos genes *torTRCA* poderia ser consequência de mutações que inabilitam o funcionamento do “operon” *ccm*. A ROD37 é resultante de uma deleção no “operon” *tor* de *S. Pullorum*, no entanto, o gene *torS* de ambos os biovars possui formação de “frameshift”. Esse gene codifica um sensor (TorS “sensor”) importante para a utilização do TMAO (ANSALDI et al., 2007) e, portanto, essa via pode não estar totalmente funcional mesmo em *S. Gallinarum*.

A ROD14, com aproximadamente dez mil pares de bases e onze *loci* preditos, foi identificada somente no biovar *Gallinarum* e se mostrou conservada entre as estirpes testadas (Figuras B11 e B12). Os *loci* dessa ROD codificam oxiredutases, reguladores de transcrição e proteínas com outras funções. Uma vez que essa ROD está ausente em *S. Pullorum* e possui conteúdo G+C de 47,13% (similar a de ilhas de patogenicidade), futuros estudos tendo essa ROD como alvo poderiam esclarecer mais sobre a sua importância para o biovar *Gallinarum*.

A ROD36 leva a formação de “pseudogene” somente em *S. Gallinarum*. Essa corresponde ao *locus* SPUL36161 de SP449/87 e se mostrou conservada em todas as estirpes testadas (Figura B30). Análises *in silico* (BLASTp) mostrou existir alta

homologia entre a sequência de aminoácidos desse *locus* e uma proteína da família NleB de *E. coli*, que é secretada pelo sistema de secreção do tipo três (SSTT) desse micro-organismo.

Os efetores NleB de *E. coli* funcionam como uma transferase que modifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato do hospedeiro, impedindo a sua ligação com uma proteína receptora (TRAF2) e suprimindo a ativação do fator nuclear Kappa B (FN- κ B) (GAO et al., 2013). O FN- κ B está ligado à resposta imune inata e sua supressão foi relacionada à inibição da resposta inflamatória inicial e persistência de *E. coli* e *Shigella* no hospedeiro (NEWTON et al., 2010). No entanto, foi sugerido que o FN- κ B não é um diferencial durante infecção causada por *S. Pullorum*, visto que em experimento realizado com cultivo celular, não houve supressão do FN- κ B por essa bactéria (SETTA et al., 2012). Futuros estudos poderiam demonstrar se esse *locus* estaria ou não envolvido na patogenicidade de *S. Pullorum*.

A ROD43 é formada por deleção nos genes *idnO* e *idnT* nos genomas de *S. Pullorum* e foi conservada entre as estirpes testadas (Figura B33). O gene *idnO* é putativamente funcional, visto que a deleção ocorreu em uma pequena porção no final do gene; no entanto, o gene *idnT*, que codifica um transportador de L-idonato e D-gliconato, sofreu uma deleção que eliminou sua extremidade 5'. As proteínas codificadas pelo "operon" *idn* estão envolvidos na produção de 6-fosfogliconato (6-PGK) a partir de L-idonato (BAUSCH et al., 1998). O 6-PGK é transformado em 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato, um composto intermediário da via Entner-Doudoroff, que quando clivado fornece fonte de carbono para a via glicolítica (BAUSCH et al., 1998). Em um estudo anterior foi demonstrado que *S. Typhimurium* utilizaria gliconato como principal fonte de carbono para sobrevivência no interior de macrófagos (ERIKSSON et al., 2003). Uma vez que o gene *idnT* é seguramente pseudogene em *S. Pullorum*, estudos futuros poderiam demonstrar o efeito da ausência desse transportador no biovar *Pullorum* e sua relação com a persistência desse micro-organismo no interior dos macrófagos.

Por fim, a ROD33, identificada em SP449/87 e composta por 14 *loci* preditos, se mostrou uma região de formação de pseudogenes (Figura 6). Os produtos dos genes contidos nessa ROD codificam proteínas relacionadas a mecanismos de resistência a antimicrobianos e a metais, conferindo à bactéria resistência a

substâncias tóxicas e capacidade de adesão celular. Além disso, foi identificado o “operon” *std*, que codifica fímbria. Esse “operon” já havia sido notificado como ausente no biovar Gallinarum por Porwollik et al. (2005), no entanto, a sua ausência no biovar Pullorum (SP RKS5078) não havia sido descrita. O *locus* SPUL30531 possui similaridade com o gene *rcnA* (*yohM*) (gene alvo da Figura 6) que codifica uma proteína ligada ao efluxo de níquel e cobalto (Ni^{2+} e Co^{2+}), metais tóxicos para a célula bacteriana, quando em altas concentração. O *locus* SPUL30601 codifica uma proteína com 99% homóloga à YfdX, que em *E. coli* confere resistência antimicrobiana ao induzir a expressão do gene *evgA*. Por último, o *locus* SPUL30611 codifica uma proteína de membrana externa, com 99% de homologia a Ail/OmpX de *S. Typhimurium* LT2, a qual confere resistência a ceftriaxona (NISHINO; YAMAGUCHI, 2002; RODRIGUE; EFFANTIN; MANDRAND-BERTHELOT, 2005; HU et al., 2009). A presença parcial da ROD33 em estirpes de *S. Pullorum* poderia ser decorrente da pressão de seleção imposta pelo ambiente.

As estirpes utilizadas no presente estudo foram agrupadas segundo a sua conservação nas RODs. De acordo com os dados demonstrados no dendrograma (Figura 4), o perfil genético das estirpes brasileiras se assemelha aquele da estirpe SP RKS5078. Esses achados estão de acordo com os de Liu et al. (2002) que afirmaram que o perfil genético da estirpe SP RKS5078 seria o predominante para o biovar Pullorum. Em contraste, o genoma de SG287/91 foi agrupado com a minoria das estirpes testadas e, provavelmente, não represente toda a diversidade genética que pode existir nesse biovar. O dendrograma ainda foi capaz de agrupar a estirpe 33 de *S. Gallinarum*, que apresentou “amplicons” em RODs esperadas apenas em *S. Pullorum*. Li et al. (1993) também relataram a identificação de uma estirpe com perfil isoenzimático ambíguo, porém essa estirpe não pôde ser agrupada junto às demais, ao contrário do presente estudo.

Para que se tenha uma melhor percepção da variabilidade genética nos dois biovars, seria necessário analisar um maior número de estirpes, preferencialmente isoladas em outras regiões do mundo. Com os dados do presente estudo, é possível perceber a necessidade de sequenciamento de mais genomas de *S. Gallinarum*. A comparação desses genomas com o da estirpe 287/91 tornaria evidente os “core

genes” nesse biovar, ajudaria a elucidar a evolução sofrida por *S. Gallinarum* e enriqueceria a análise comparativa com *S. Pullorum*.

A quantidade de genes relacionados à virulência, que estão presentes em somente uma das estirpes é relativamente pequena e, portanto, não são suficientes para explicar a diferença na patogenicidade de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Estudos futuros que avaliem os transcritos desses micro-organismos em diferentes fases da infecção seriam úteis para identificar quais genes, de fato, estão sendo utilizados durante a infecção por *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- A quantidade de genes relacionados à virulência, que estão presentes em somente uma das estirpes é relativamente pequena e, portanto, não foram suficientes para explicar a diferença na patogenicidade de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.
- Os genomas de SP449/87 e SP RKS5078 demonstram organização e conteúdo genético semelhantes ao de SG287/91 (colinearidade). Há elevado acúmulo de “pseudogenes” em SP449/87 e SP RKS5078. Ao que tudo indica, esse biovar está sofrendo um processo de “evolução por redução”.
- Foram identificadas 68 RODs nos genomas de SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078. Essas são decorrentes da inativação de genes relacionados a “operons” fimbriais, proteínas de superfície celular e vias de produção de energia em anaerobiose nos dois biovars.
- Algumas das RODs identificadas não se mantiveram conservadas entre os isolados testados.
- As estirpes de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* estudadas foram agrupadas em dois grandes grupos, os quais se divergiam em subgrupos (2 em *S. Pullorum* e 3 em *S. Gallinarum*). Para uma melhor percepção da variabilidade genética nos dois biovars, seria necessário sequenciar mais genomas.
- A partir dos dados gerados, é possível conjecturar que características negativas (de perdas) seriam responsáveis pelas diferentes patogenias e epidemiologias da pulorose em relação ao tifo aviário.

- O elevado acúmulo de “pseudogenes” em *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* sugere que esses micro-organismos utilizariam nutrientes e vias metabólicas do hospedeiro em seus metabolismos.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANSALDI, M.; THÉRAULAZ, L.; BARAQUET, C.; PANIS, G.; MÉJEAN, V. Aerobic TMAO respiration in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 484-494, 2007.

ASHKAR, A. A.; MOSSMAN, K. L.; COOMBES, B. K.; GYLES, C. L.; MACKENZIE, R. FimH adhesin of type 1 fimbriae is a potent inducer of innate antimicrobial responses which requires TLR4 and type 1 interferon signalling. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 4, n. 12, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000233>>.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A.; BINNS, M. M. Contribution of *Salmonella* gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 2, p. 388-392, 1987.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella* Pullorum. **Journal of General Microbiology**, London, v. 134, n. 8, p. 2307-2316, 1988.

BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella* gallinarum, *S. pullorum*, and *S. typhimurium*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 10, p. 3136-3141, 1989.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, London, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BATISTA, D. F. A.; DE FREITAS NETO, O. C.; LOPES, P. D.; DE ALMEIDA, A. M.; BARROW, P. A.; BERCHIERI JR, A. Polymerase chain reaction assay based on *ratA* gene allows differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 25, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1177/1040638713479361>>.

BAUSCH, C.; PEEKHAUS, N.; UTZ, C.; BLAIS, T.; MURRAY, E.; LOWARY, T.; CONWAY, T. Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals a novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 14, p. 3704-3710, 1998.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; DE OLIVEIRA, G. H.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hens lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2000.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, London, v. 30, n. 3, p. 221-231, 2001.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 435-453.

BLONDEL, C. J.; YANG, H. J.; CASTRO, B.; CHIANG, S.; TORO, C. S.; ZALDÍVAR, M.; CONTRERAS, I.; ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; SANTIVIAGO, C. A. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. **PloS One**, San Francisco, v. 5, n. 7, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011724>>.

BOYD, E. F.; WANG, F. S.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Molecular genetic relationship of the *Salmonellae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 804-808, 1996.

BRASIL. Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Atos legais. Instrução Normativa nº 78. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília – DF, 03 nov 2003. Seção 1, p 1-9.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN, M.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. ACT: The Artemis Comparison Tool. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 16, p. 3422-3423, 2005.

CHAN, K.; BAKER, S.; KIM, C. C.; DETWEILER, C. S.; DOUGAN, G.; FALKOW, S. Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by Use of an *S. enterica* Serovar Typhimurium DNA Microarray. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 2, p. 553-563, 2003.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>>.

CHRISTENSEN, J. P.; OLSEN, J. E.; HANSEN, H. C.; BISGAARD, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* biovar *gallinarum* and *pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis. **Avian Pathology**, London, v. 21, n. 3, p. 461-470, 1992.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

CRICHTON, P. B, OLD, D. C. *Salmonellae* of serotypes *gallinarum* and *pullorum* grouped by biotyping and fimbrial-gene probing. **Journal of Medical Microbiology**, Livingstone, v. 32, n. 3, p. 145-152, 1990.

CROSA, J.H.; BRENNER, D. J.; EWING, W. H.; FALKOW, S. Molecular relationship among the *Salmonellae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 115, n. 1, p. 307-315, 1973.

DE OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JÚNIOR, A. FERNANDES, A. C. Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 51-56, 2005.

DESAI, A. R.; SHAH, D. H.; SHRINGI, S.; LEE, M. J.; LI, Y. H.; CHO, M. R.; PARK, J. H.; EO, S. K.; LEE, J. H.; CHAE, J. S. An allele-specific PCR assay for the rapid and serotype-specific detection of *Salmonella* Pullorum. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 49, n. 4, p. 558-561, 2005.

DIEYE, Y.; AMEISS, K.; MELLATA, M.; CURTISS, R. 3RD. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **BMC Microbiology**, London, v. 9, n. 3, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-3>>.

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

EDWARDS, P. R.; EWING, W. H. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th edition. New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986. 536 p.

EDWARDS, R. A.; OLSEN, G. J.; MALOY, S. R. Comparative genomics of closely related *Salmonellae*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 94-99, 2002.

ELLIS, E. M.; WILLIAMS, J. E.; MALLINSON, E. T.; SNOEYENBOS, G. H.; MARTIN, W. J. Culture methods for the detection of animal salmonellosis and Arizonosis. In: ELLIS, E. M. (Eds). **A manual of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians**. Ames IA: Iowa State University Press, 1976. p. 48–54.

ERIKSSON, S.; LUCCHINI, S.; THOMPSON, A.; RHEN, M.; HINTON, J. C. Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 103-118, 2003.

ESWARAPPA, S. M.; JANICE, J.; BALASUNDARAM, S. V.; DIXIT, N. M.; CHAKRAVORTTY, D. Host-specificity of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: Insights from comparative genomics. **Infection, Genetics and Evolution**, New York, v. 9, n. 4, p. 468-473, 2009.

FENG, Y.; XU, H.; LI, Q.; ZHANG, S.; WANG, C.; ZHU, D.; CAO, F.; LI, Y.; JOHNSTON, R. N.; ZHOU, J.; LIU, G.; LIU, S. Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Pullorum RKS5078. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, n.3, p. 744, 2012.

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**, London, v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059427>>.

FOOKES, M.; SCHROEDER, G. N.; LANGRIDGE, G. C.; BLONDEL, C. J.; MAMMINA, C.; CONNOR, T. R.; SETH-SMITH, H.; VERNIKOS, G. S.; ROBINSON, K. S.; SANDERS, M.; PETTY, N. K.; KINGSLEY, R. A.; BÄUMLER, A. J.; NUCCIO, S. P.; CONTRERAS, I.; SANTIVIAGO, C. A.; MASKELL, D.; BARROW, P.;

HUMPHREY, T.; NASTASI, A.; ROBERTS, M.; FRANKEL, G.; PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; THOMSON N. R. *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the *Salmonellae*. **PloS Pathogens**, London, v. 7, n. 8, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191>>.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; ELAZOMI, A.; KAISER, P.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; JONES, M. A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla(+)) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 435-433, 2013.

FRENDÉUS, B.; WACHTLER, C.; HEDLUND, M.; FISCHER, H.; SAMUELSSON, P.; SVENSSON, M.; SVANBORG, C. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 37-51, 2001.

GAO, X.; WANG, X.; PHAM, T. H.; FEUERBACHER, L. A.; LUBOS, M. L.; HUANG, M.; OLSEN, R.; MUSHEGIAN, A.; SLAWSON, C.; HARDWIDGE, P. R. NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- κ B activation. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 13, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.11.010>>.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 1-17.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars." **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Institut Pasteur, Paris, France, 2007.

GRUNENWALD, H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. **PCR Protocols, Vol. 226 (Methods in Molecular Biology)**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2003. cap. 20, p. 89-99.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I., BOCKMÜHL, J., GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, n. 1, p.26-29, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series (2004)**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 95-98, 1999.

HAPFELMEIER, S.; STECHER, B.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; MÜLLER, A. J.; HEIKENWALDER, M.; STALLMACH, T.; HENSEL, M.; PFEFFER, K.; AKIRA, S.; HARDT, W. D. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)-2 and SPI-1 Type III Secretion Systems Allow *Salmonella* Serovar *typhimurium* to Trigger Colitis via MyD88-Dependent and MyD88-Independent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, n. 3, p. 1675-1685, 2005.

HOLT, K. E.; THOMSON, N. R.; WAIN, J.; LANGRIDGE, G. C.; HASAN, R.; BHUTTA, Z. A.; QUAIL, M. A.; NORBERTCZAK, H.; WALKER, D.; SIMMONDS, M.; WHITE, B.; BASON, N.; MUNGALL, K.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 36, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-36>>.

HU, W. S.; LIN, J. F.; LIN, Y. H.; CHANG, H. Y. Outer membrane protein STM3031 (Ail/OmpX-like protein) plays a key role in the ceftriaxone resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00079-09>>.

JONES, M. J.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *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**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

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. Differential identification of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum and Pullorum based on polymorphic regions of *glgC* and *speC* genes. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 147, n. 1-2, p. 181-185, 2011.

KIDGELL, C.; REICHARD, U.; WAIN, J.; LINZ, B.; TORPDAHL, M.; DOUGAN, G.; ACHTMAN, M. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 2, n.1, p. 39-45, 2002.

KIMBROUGH, T. G.; MILLER, S. I. Contribution of *Salmonella* typhimurium type III secretion components to needle complex formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 20, p. 11008-11013, 2000.

KINGSLEY, R. A.; MSEFULA, C. L.; THOMSON, N. R.; KARIUKI, S.; HOLT, K. E.; GORDON, M. A.; HARRIS, D.; CLARKE, L.; WHITEHEAD, S.; SANGAL, V.; MARSH, K.; ACHTMAN, M.; MOLYNEUX, M. E.; CORMICAN, M.; PARKHILL, J.; MACLENNAN, C. A.; HEYDERMAN, R. S.; DOUGAN, G. Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 12, p. 2279-2287, 2009.

KISIELA, D., KUCZKOWSKI, M., KICZAK, L., WIELICZKO, A., UGORSKI, M. Differentiation of *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum from *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum by PCR-RFLP of the *fimH* gene. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 52, n. 5, p. 214-218, 2005.

LAWRENCE, J. G.; HENDRICKSON, H. Genome evolution in bacteria: order beneath chaos. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 8, n. 5, p. 572-578, 2005.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*: Request for an Opinion. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 465-446, 1987.

LI, J.; SMITH, N. H.; NELSON, K.; CRICHTON, P. B.; OLD, D. C.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile *Salmonellae*. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 38, n. 2, p. 129-139, 1993.

LI, Q.; XU, Y.; JIAO, X. Identification of *Salmonella* pullorum Genomic Sequences Using Suppression Subtractive Hybridization. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 9, p. 898-903, 2009.

LIU, G. R.; RAHN, A.; LIU, W. Q.; SANDERSON, K. E.; JOHNSTON, R. N.; LIU, S. L. The Evolving Genome of *Salmonella enterica* Serovar Pullorum. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 10, p. 2626-2633, 2002.

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

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R. K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, London, v. 413, n. 6858, p. 852-856, 2001.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; PORWOLLIK, S.; SABO, A.; MEYER, R.; BIERI, T.; OZERSKY, P.; MCLELLAN, M.; HARKINS, C. R.; WANG, C.; NGUYEN, C.; BERGHOFF, A.; ELLIOTT, G.; KOHLBERG, S.; STRONG, C.; DU, F.; CARTER, J.; KREMIZKI, C.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; SUN, H.; FULTON, L.; NASH, W.; MINER, T.; MINX, P.; DELEHAUNTY, K.; FRONICK, C.; MAGRINI, V.; NHAN, M.; WARREN, W.; FLOREA, L.; SPIETH, J.; WILSON, R. K. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. **Nature Genetics**, London, v. 36, n. 12, p. 1268-1274, 2004.

MCMECHAN, A.; LOVELL, M. A.; COGAN, T. A.; MARSTON, K. L.; HUMPHREY, T. J.; BARROW, P. A. Glycogen production by different *Salmonella enterica* serotypes: contribution of functional *glgC* to virulence, intestinal colonization and environmental survival. **Microbiology**, v.151, n. 12, p. 3969-3977, 2005.

MCQUISTON, J. R.; HERRERA-LEON, S.; WERTHEIM, B. C.; DOYLE, J.; FIELDS, P. I.; TAUXE, R. V.; LOGSDON Jr, J. M. Molecular phylogeny of the *Salmonellae*: Relationship among *Salmonella* species and subspecies determined from four housekeeping genes and evidence of lateral gene transfer events. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 21, p. 7060-7067, 2008.

NEWTON, H. J.; PEARSON, J. S.; BADEA, L.; KELLY, M.; LUCAS, M.; HOLLOWAY, G.; WAGSTAFF, K. M.; DUNSTONE, M. A.; SLOAN, J.; WHISSTOCK, J. C.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R. M.; JANS, D. A.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; COULSON, B. S.; HARTLAND, E. L. The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF-kappaB p65. **PloS Pathogens**, San Francisco, v. 6, n. 5, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000898>>.

NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. *EvgA* of the two-component signal transduction system modulates production of the *yhiUV* multidrug transporter in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 8, p. 2319, 2323, 2005.

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.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). Fowl typhoid and Pullorum disease, capítulo 2.3.11. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, 7th Ed. Paris: OIE, 2012. p. 538-548.

OSMAN, K. M.; ALI, M. M.; RADWAN, M. I.; KIM, H. K.; HAN, J. Comparative proteomic analysis on *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Enteritidis exploring proteins that may incorporate host adaptation in poultry. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 5, p. 815-821, 2009.

PAIVA, J. B.; CAVALLINI, J. S.; SILVA, M. D.; ALMEIDA, M. A.; ÂNGELA, H. L.; BERCHIERI JUNIOR, A. Molecular differentiation of *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by RFLP of *fliC* gene from Brazilian isolates. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 11, n. 4, p. 271-276, 2009.

PARK, M. K.; CHOI, K. S.; KIM, M. C.; CHAE, J. S. Differential diagnosis of *Salmonella* Gallinarum and *S. Pullorum* using PCR-RFLP. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 2, n. 3, p. 213-219, 2001.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, Basingstoke, v. 413, n. 6858, p. 848-852, 2001.

PINHEIRO, L. A.; DE OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI JUNIOR, A. Experimental *Salmonella enterica* serovar Pullorum infection in two commercial varieties of laying hens. **Avian Pathology**, London, v. 30, n. 2, p. 129-133, 2001.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR; L. E. Genus XXIII. *Salmonella* Lignères 1900, 389AL. In: GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. New York, 2005, p. 764-799.

PORWOLLIK, S.; WONG, R. M. Y.; MCCLELLAND, M. Evolutionary genomics of *Salmonella*: Gene acquisition revealed by microarray analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 13, p. 8956-8961, 2002.

PORWOLLIK, S.; MCCLELLAND, M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. **Microbes and Infection**, New York, v. 5, n. 11, p. 977-989, 2003.

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.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Versão 2.11.1. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2010. 1766 p.

REEVES, M. W.; EVINS, G. M.; HEIBA, A. A.; PLIKAYTIS, B. D.; FARMER, J. J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

RIBEIRO, S. A. M.; PAIVA, J. B.; ZOTESSO, F.; LEMOS, M. V. F.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Molecular differentiation between *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Pullorum and *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 184-188, 2009.

RODRIGUE, A.; EFFANTIN, G.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 8, p. 2912-2916, 2005.

ROZEN, S.; SKALETISKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in molecular biology**, New Jersey, v. 132, n. 1, p. 365-386, 2000.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Cap. 6, p. 6.1-6.62.

SETTA, A.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF- κ B signalling and cell cytotoxicity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 146, n. 3-4, 2012. Disponível em :<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.03.008>>.

SHAH, D. H.; PARK, J. H.; CHO, M. R.; KIM, M. C.; CHAE, J. S. Allele-specific PCR method based on *rfbS* sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific *rfbS* sequence polymorphism. **Journal of microbiological methods**, v. 60, n. 2, p. 169-177, 2005.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue scientifique et technique** (International Office of Epizootics), Paris, v. 19, p. 405-424, 2000.

SNEATH, P. H. A., SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practise of numeral classification. San Francisco: W. H. Freeman & Co., 1973. 573 p.

TANAPONGPIPAT, S.; REID, E.; COLE, J. A.; CROOKE, H. Transcriptional control and essential roles of the *Escherichia coli ccm* gene products in formate-dependent nitrite reduction and cytochrome c synthesis. **The Biochemical Journal**, London, v. 334, n. 2, p. 355-365, 1998.

THOMSON, 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.; MUNGALL, K.; SANDERS, M.; WHITEHEAD, S.; CHABALGOITY, J. A.; MASKELL, D.; HUMPHREY, T.; ROBERTS, M.; BARROW, P. A.; DOUGAN, G.; PARKHILL, J. 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.

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.

TEPLYAKOV, A.; OBMOLOVA, G.; KHIL, P. P.; HOWARD, A. J.; CAMERINI-OTERO, R. D.; GILLILAND, G. L. Crystal structure of the *Escherichia coli* YcdX protein reveals a trinuclear zinc active site. **Proteins**, New York, v. 51, n. 2, p. 315-318, 2003.

TÜKEL, C.; RAFFATELLU, M.; HUMPHRIES, A. D.; WILSON, R. P.; ANDREWS-POLYMENIS, H. L.; GULL, T.; FIGUEIREDO, J. F.; WONG, M. H.; MICHELSEN, K. S.; AKÇELIK, M.; ADAMS, L. G.; BÄUMLER, A. J. CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that is recognized by Toll-like receptor 2. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 289-304, 2005.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTORES (UBABEF). **Relatório Anual**, 2012. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/>>. Acesso em: 28 Mai 2013.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VOLLMER, J.; WEERATNA, R. D.; JURK, M.; SAMULOWITZ, U.; MCCLUSKIE, M. J.; PAYETTE, P.; DAVIS, H. L.; SCHETTER, C.; KRIEG, A. M. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. **Immunology**, Oxford, v. 113, n. 2, p. 212-223, 2004.

WAYNE, L.; BRENNER, D.; COLWELL, R.; GRIMONT, P.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.; MOORE, L.; MOORE, W.; MURRAY, R.; STACKEBRANDT, E.; Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WOOD, M. W.; JONES, M. A.; WATSON, P. R.; SIBER, A. M.; MCCORMICK, B. A.; HEDGES, S.; ROSQVIST, R.; WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. The secreted effector protein of *Salmonella dublin*, SopA, is translocated into eukaryotic cells and influences the induction of enteritis. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 293-303, 2000.

WORLD POULTRY. Fowl typhoid strikes layer farm in Northern Ireland. Disponível em: <<http://www.worldpoultry.net/Layers/Health/2012/11/Fowl-typhoid-strikes-layer-farm-in-Northern-Ireland-1099165W/>>. Acesso em: 28 de mar. 2013.

WU, K. Y.; LIU, G. R.; LIU, W. Q.; WANG, A. Q.; ZHAN, S.; SANDERSON, K. E.; JOHNSTON, R. N.; LIU, S. L. The genome of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum: distinct insertions/deletions and rare rearrangements. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, n. 14, p. 4720-4727, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A: Dados completos de todas as RODs identificadas (Tabela 1A) e das ilhas de patogenicidades/"operons" fimbriais (Tabela 2A) localizados nos genomas de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*

Tabela 1A. Regiões de diferença (RODs) encontradas durante comparação dos genomas de *S. Gallinarum* 287/91 com *S. Pullorum* 449/87 e *S. Pullorum* RKS5078

ROD	Locus/Loci envolvidos	Genoma de referência	Posição	Evento**
ROD1*	<i>citE</i>	SG287/91	70339 – 70400	"Frameshift" em SP449 e RKS ("pseudogene")
ROD1a	<i>yadI</i>	SP449/87	144911 – 144921	Deleção ("frameshift") em SG ("pseudogene")
ROD2*	<i>stfA</i> e <i>stfC</i>	SG287/91	232813 – 233283	Deleção nas porções final do gene <i>stfA</i> e inicial do gene <i>stfC</i> em SP449 (ambos são "pseudogene")
ROD2a	<i>safC</i>	SP449/87	276566 – 276586	"Pseudogene" em SG, mas funcional em SP449 e RKS
ROD3	<i>mod</i>	SG287/91	401583 – 401687	"Pseudogene" em SG287/91 e SP RKS5078. Estado de degradação mais avançado em RKS. É polimórfico em SP449/87.
ROD4*	<i>res</i>	SG287/91	404337 – 404408	"Pseudogene" em SP449/87 e SP RKS5078 (mesmo ponto de mutação). O gene está intacto em SG287/91, mas o sistema integrado <i>mod+res</i> não deve ser funcional.
ROD5*	<i>yail</i>	SP449/87	373404 – 373654	Gene intacto em SP449. Deleção ("frameshift") em SG e RKS ("pseudogene")
ROD6*	<i>fimA</i> e <i>fimI</i>	SG287/91	601788 – 603167	Ausência de ambos em SP449
ROD7*	<i>ybgL</i>	SG287/91	771398 – 771456	Deleção neste gene no mesmo ponto em SP449 e RKS. Pode ser funcional
ROD8*	<i>tolA</i>	SG287/91	792877 – 792918	"Frameshift" em SP449 ("pseudogene")
ROD9*	<i>ylid</i>	SG287/91	899846 – 900148	Grande deleção no gene em SP449 ("pseudogene")
ROD10	<i>ftsK</i>	SP449/87	906864 – 907085	Inserção em torno de 222 pb em SP449. Gene aparentemente funcional
ROD11*	<i>ycdC</i>	SP449/87	1027788 – 1028132	Deleção das primeiras 246 bases em SG e RKS ("pseudogene"). Gene funcional em SP449
ROD12*	SG1034	SG287/91	1122330 – 1122392	Deleção em SP449 e RKS, mas o gene parece ser funcional
ROD13*	SPUL13101	SP449/87	1281847 – 1281957	Gene funcional em SP449. "Frameshift" em SG e RKS ("pseudogene")
ROD14*	SG1441 – SG1453	SG287/91	1511861 – 1522074	Extensa deleção em SP449 e RKS com muitos genes envolvidos (conteúdo GC abaixo da média do genoma). Possui similaridade, por BLASTp, com alguns ortólogos em <i>S. Choleraesuis</i> SC-B67 (98% de similaridade) e em <i>S. Heidelberg</i> str. B182 (91% de similaridade)
ROD15*	SG1517	SG287/91	1587974 – 1588354	Deleção do terço inicial do locus em SP449 e RKS ("pseudogene")
ROD16*	<i>ycdW</i> , <i>ycdX</i> e <i>srfC</i>	SG287/91	1597222 – 1598758	Gene <i>ycdX</i> sem ortólogo em SP449/87. Deleção do terço final do gene <i>ycdW</i> e deleção da porção final do gene <i>srfC</i> em SP449 ("pseudogene")
ROD17*	<i>srfA</i> , <i>ycdY</i> e <i>ycdZ</i>	SG287/91	1604167 – 1605769	Ausência dos genes <i>ycdY</i> e <i>ycdZ</i> e deleção da metade inicial do gene <i>srfA</i>

ROD18*	SPUL15811 e SPUL15821	SP449/87	1539547 – 1539797	em SP449/87 (“pseudogene”)
ROD19* e 20*	SPUL16221, pqaA	SP449/87	1577744 – 1584946	<i>Loci</i> intactos em SP449. Seus ortólogos são “pseudogenes” em SG e RKS devido a “codon” de parada prematuro e deleção da extremidade 3’
ROD21*	<i>dmsA1</i>	SP449/87	1624612 – 1624839	Região grande excluída de SG e RKS ou com <i>loci</i> remanescentes
ROD22*	<i>mdtI</i> e <i>mdtJ</i>	SP449/87	1642490 – 1643822	Gene intacto em SP449. “Frameshift” em SG e RKS (“pseudogene”)
ROD22a	<i>gst</i>	SG287/91	1742971 – 1742994	Genes presentes em SP449 e RKS e ausentes em SG
ROD23*	SPUL19031 – SPUL19061	SP449/87	1847551 – 1853997	Deleção de 24 pb em SP449. Gene funcional.
ROD23a	<i>fhuE</i>	SP449/87	1985623 – 1986343	Três <i>loci</i> intactos em SP449 e ausentes em SG e RKS. Existe um quarto (Spul19061) que é remanescente em SG e RKS
ROD24*	<i>ycdY</i> e <i>ycdX</i>	SP449/87	1985684 – 1986343	Deleção que leva a “frameshift” e a “codon” de parada prematuro em SP449 e RKS (“pseudogene”)
ROD25	<i>pduO</i>	SP449/87	2061767 – 2061786	Remanescentes em SG e RKS (“pseudogenes”)
ROD25a	<i>pduS</i>	SG287/91	2123740 – 2123759	“Frameshift” em SG287/91 (“pseudogene”)
ROD26	<i>sopA</i>	SP449/87	2078548 – 2078595	Polimorfismo no gene em SP449. Parece funcional
ROD27*	<i>yeiU</i>	SG287/91	2307376 – 2307432	“Pseudogene” em SP449, SG e RKS, mas está em estado de degradação mais avançado nas duas últimas
ROD27a	<i>narP</i>	SG287/91	2331888 – 2331970	Deleção com formação de “frameshift” em SP449 e RKS (“pseudogene”)
ROD28	<i>ccmA</i>	SG287/91	2338109 – 2338439	Gene intacto em SG e SP449, mas com formação de “frameshift” em RKS (“pseudogene”)
ROD29	<i>shdA</i>	SG287/91	2623610 – 2623661	Deleção com formação de “frameshift” em SP449 e RKS (“pseudogene”)
ROD30*	<i>ratA</i>	SG287/91	2636272 – 2637064	Existem algumas deleções em SP449 e RKS, mas aparentemente não tornam o gene inativo. “Pseudogene” em SG (“frameshift”)
ROD31	Genes de rRNA	SG287/91	2739662 – 2744716	Há duas deleções em SP449 e uma em RKS, mas aparentemente elas não inativam o gene.
ROD31a	<i>gabDT</i>	SG287/91	2817219 – 2817302	Ausência de dois <i>loci</i> de RNA ribossômico 23S em SP449
ROD32*	SG2814,15 e 16	SG287/91	2929141 – 2932287	Deleção pequena no gene <i>gabD</i> em RKS, mas aparentemente, não atrapalha a funcionalidade do gene. Gene <i>gabT</i> é “pseudogene” nas SPs e em SG (“codon” de parada prematuro e “frameshift”, respectivamente)
ROD33*	SPUL30501 – SPUL30641	SP449/87	2987210 – 3000249	O <i>locus</i> SG2815 está ausente e os <i>loci</i> SG2814 e 2816 são remanescentes em SP449
ROD33a	<i>ygfYX</i>	SG287/91	3071653 – 3071788	Região extensa presente em SP449 e ausentes de SG e RKS
ROD33b	<i>yhdP</i>	SG287/91	3397306 – 3398041	Deleção na porção final do gene <i>ygfY</i> e no terço inicial do gene <i>ygfX</i> em RKS (“pseudogene”)
ROD34*	<i>glpKX</i>	SG287/91	3491057 – 3493051	Deleção em RKS, mas o gene parece ser funcional
ROD35	<i>yihT</i>	SG287/91	3553378 – 3553789	Deleção afeta quase toda a extensão dos genes. São “pseudogenes” em SP449, mas estão intactos em RKS
ROD36*	SPUL36161	SP449/87	3550517 – 3550551	É “pseudogene” em SG e SP449 e RKS, mas está em estado de degradação mais avançado nessas últimas
ROD36a	<i>rthB</i>	SP449/87	3606935 – 3606978	<i>Locus</i> intacto em SP449 e RKS. “Frameshift” em SG (“pseudogene”)
ROD36b	<i>yidZ</i>	SP449/87	3715598 – 3715609	Intacto em SP449. “Frameshift” em SG e RKS (“pseudogene”)
ROD36c	<i>yidY</i>	SP449/87	3715973 – 3716027	Gene funcional, mas com polimorfismo em SG e RKS em relação a SP449
ROD37*	<i>torTRCA</i>	SG287/91	3798776 – 3802440	Gene funcional, mas com polimorfismo em SG e RKS em relação a SP449
				Ausência dos genes <i>torRC</i> dos genomas de SP449 e RKS. Presença de

ROD38	<i>ccmDE</i>	SG287/91	3807812 – 3807963	remanescentes dos genes <i>torTA</i> nestas.
ROD39*	<i>ccmF</i>	SG287/91	3809372 – 3809432	São “pseudogenes” em SP449 (remanescentes)
ROD40	<i>dsbE2 (ccmG)</i>	SG287/91	3810714 – 3810938	Gene polimórfico em SP449, mas funcional
ROD41	<i>ccmH</i>	SG287/91	3811286 – 3811369	Deleção da porção terminal do gene em SP449 (“pseudogene”)
ROD41a	<i>uhpT</i>	SP449/87	3779872 – 2779883	Deleção da porção 5’ do gene em SP449. Formação de “frameshift” em SP449 e RKS (“pseudogene”)
ROD41b	<i>misL</i>	SG287/91	3861984 – 3862072	Gene polimórfico em SG, mas funcional
ROD41c	<i>malS</i>	SG287/91	3964807 – 3966818	Gene polimórfico em RKS
ROD41d	<i>dppD</i>	SP449/87	3947841 – 3947851	Gene funcional em SP449 e RKS. “Pseudogene” em SG
ROD41e	<i>bcsC</i>	SP449/87	3964584 – 3964633	Gene funcional em SP449 e RKS. “Pseudogene” em SG
ROD41f	<i>bigA</i>	SG287/91	4186280 – 4186388	Gene polimórfico em SG e RKS
ROD41g	SPUL42551	SP449/87	4211604 – 4211727	“Pseudogene” em SP449 e SG. Em RKS é polimórfico e, aparentemente, funcional
ROD41h	<i>melB</i>	SG287/91	4379811 – 4379853	Gene funcional em SP449, mas “pseudogene” em SG e RKS (“codon” de parada prematuro)
ROD42	<i>dmsA2</i>	SG287/91	4388943 – 4389090	Deleção com formação de “frameshift” em SP449 e RKS (“pseudogene” em ambas)
ROD42a	<i>aidB</i>	SP449/87	4395965 – 4395984	“Pseudogene” em SG, SP449 e RKS, mas está em estado de degradação mais avançado nessa últimas
ROD43*	<i>idnTO</i>	SG287/91	4539329 – 4540181	Formação de “frameshift” em SG (“pseudogene”). Funcional em SP449 e RKS
				Remanescentes em SP449 e RKS (“pseudogene”)

* RODs que foram testadas na PCR

** Eventos confirmados por meio de comparação com o genoma de *S. Enteritidis* PT4. SG: *S. Gallinarum* 287/91; SP449: *S. Pullorum* 449/87; RKS: *S. Pullorum* RKS5078

Tabela 2A. Posição das SPIs e “operons” fimbriais em SG287/91 e SP449/87

Nome	Tipo	Loci em SG287/91*	Loci em SP449/87	Observações
<i>bcf</i>	“Operon” fimbrial	SG0023 – SG0030	SPUL46801 – SPUL46871	Gene <i>bcfE</i> é “pseudogene” em SP449 (“frameshift”). Provavelmente o “operon” não é funcional nesse micro-organismo.
<i>sti</i>	“Operon” fimbrial	SG0177 – SG0180	SPUL01331 – SPUL01361	Gene <i>stiC</i> é “pseudogene” em SP449, SP RKS5078 e SG287/91. Provavelmente esse “operon” não é funcional em nenhuma delas.
<i>stf</i>	“Operon” fimbrial	SG0199 – SG0204	SPUL01561 – SPUL01611	Genes <i>stfA</i> e <i>stfC</i> estão ausentes de SP449 (ROD2). O gene <i>stfF</i> é “pseudogene” em SP449, SP RKS5078 e SG287/91. Provavelmente sem função nelas.
SPI-6	Ilha de Patogenicidade	SG0263 – SG0318	SPUL02261 – SPUL02851	Região de SP449/87 que possui colinearidade com a região homóloga em SG287/91. Um conjunto de genes não está presentes na região homóloga de <i>S. Enteritidis</i> PT4. O “operon” <i>saf</i> ‘pseudo em SG.
<i>saf***</i>	“Operon” fimbrial	SG0308 – SG0312	SPUL02751 – SPUL02781	Genes intactos em SP449 e RKS. <i>safC</i> é pseudo em SG287/91.
<i>stb</i>	“Operon” fimbrial	SG0346 – SG0350	SPUL03161 – SPUL03201	O gene <i>stbC</i> é “pseudogene” em SP449, SP RKS5078 e SG287/91. Provavelmente sem função nelas.
<i>fim</i>	“Operon” fimbrial	SG0555 – SG0564	SPUL05371 – SPUL05441	Remanescente em SP449/87 (ROD6). Não é funcional nela.
SPI-16	Ilha de Patogenicidade	SG0567 – SG0569	SPUL05481 – SPUL05501	Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4
SPI-12	Ilha de Patogenicidade	SG0703 – SG0709	SPUL_0640–SPUL_0655**	Gene <i>sspH2</i> é pseudo em SG287/91, SP449/87 e SP RKS5078. O “operon” <i>ccm</i> que da SPI-12 está ausente em SP449/87 com relação ao genoma de <i>S. Enteritidis</i> PT4. Além disso, possui “pseudogenes” tanto em SP449/87 (RODs38, 40 e 41) quanto em SP RKS5078. Polimorfismo no gene <i>narP</i> de SP RKS5078.
SPI-14	Ilha de Patogenicidade	SG0835 – SG0840	SPUL08331 – SPUL08391	Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4
SPI-5	Ilha de Patogenicidade	SG0976 – SG0985	SPUL09901 – SPUL09961	Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4
SPI-19	Ilha de Patogenicidade	SG1024 – SG1054	SPUL10391 – SPUL10721	Apresenta colinearidade entre SP449/87 e SG287/91. No entanto, há formação de “pseudogene” em dois loci de SP RKS5078 ortólogos de SG1045 e SG1048.
SPI-2	Ilha de Patogenicidade	SG1694 – SG1738	SPUL17521 – SPUL17961	Formação de “pseudogene” em SP449/87 e SP RKS5078 em vários loci. <i>ttrB</i> é pseudo em ambas. <i>ttrC</i> e <i>ttrS</i> são pseudo em SP449/87 e SP RKS5078, respectivamente.
SPI-11	Ilha de Patogenicidade	SG1875 – SG1882	SPUL19461 – SPUL19571	Parcialmente presente e com presença de “pseudogene” (gene <i>envF</i>) em SP449/87, SP RKS5078 e SG287/91.
<i>csg***</i>	“Operon fimbrial”	SG1977–SG1983	SPUL20551 – SPUL20621	Genes intactos em SG287/91, SP449/87 e SP SP RKS5078
<i>peg</i>	“Operon” fimbrial	SG2182 – SG2186	SPUL22731 – SPUL22771	Os genes <i>pegDCB</i> são “pseudogenes” em SP449/87. “Operon” não é funcional também em SP RKS5078.
SPI-17	Ilha de Patogenicidade	SG2425 – SG2430A	SPUL25231 – SPUL25301	O ortólogo do loci SG2430 e SG2430A são “pseudogenes” em SP449/87, SP SP RKS5078 e SG287/91.

SPI-9	Ilha de Patogenicidade	SG2666 – SG2671	SPUL27731 – SPUL27761	Presença de “pseudogenes” em SP449/87 e SP RKS5078, assim como se observa em SG287/91. Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4 Gene <i>steB</i> é “pseudogene” em SP449/87. Este “operon” não é funcional nela. Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4 O <i>locus</i> SPUL38591 é “pseudogene” em SP449/87 e seus ortólogos em SP RKS5078, SG287/91 e <i>S. Enteritidis</i> PT4 também o são. Genes <i>ipfE</i> e <i>ipfC</i> são “pseudogenes” em SP449/87 e SP RKS5078. Não é funcional em SG287/91 também. Mostra colinearidade entre SP449/87, SG287/91, SP RKS5078 e <i>S. Enteritidis</i> PT4. Acúmulo de “pseudogenes” no “operon” <i>sef</i> presente nessa ilha em SP449/87, SP RKS5078 e SG287/91. Genes <i>sefC</i> e <i>sefD</i> são “pseudogenes” em SP449, RKS6078 e SG287/91. “Operon” não funcional nelas. Genes <i>sthE</i> e <i>sthA</i> são “pseudogenes” em SP449/87 e SP RKS5078. Também não é funcional em SG287/91. “Operon” intacto e possivelmente funcional em SP449/87, mas ausente em SG287/91 e SP RKS5078. Acúmulo de “pseudogenes” nesta ilha em ambos os biovars. <i>shdA</i>, <i>ratB</i> e <i>sivH</i> são pseudo em SG287/91. Os genes <i>ratB</i> e <i>sivH</i> são pseudo em SP RKS5078 e somente o <i>ratB</i> é pseudo em SP449/87.
SPI-1	Ilha de Patogenicidade	SG2764 – SG2806	SPUL28761 – SPUL29181	
<i>ste</i>	“Operon” fimbrial	SG2859 – SG2864	SPUL29761 – SPUL29811	
SPI-13	Ilha de Patogenicidade	SG3011 – SG3017	SPUL31541 – SPUL31601	
SPI-3	Ilha de Patogenicidade	SG3665 – SG3680	SPUL38601 – SPUL38461	
<i>lpf</i>	“Operon” fimbrial	SG3793 – SG3798	SPUL39851 – SPUL39811	
SPI-4	Ilha de Patogenicidade	SG4100 – SG4105	SPUL43001 – SPUL43051	
SPI-10	Ilha de Patogenicidade	SG4311 – SG4325	SPUL45281 – SPUL45421	
<i>sef</i>	“Operon” fimbrial	SG4318 – SG4322	SPUL45311 – SPUL45351	
<i>sth</i>	“Operon” fimbrial	SG4413 – SG4417	SPUL46491 – SPUL46531	
<i>std</i> ***	“Operon” fimbrial	Ausente	SPUL30571 – SPUL30591	
CS54	Ilha de Patogenicidade	SG2545 – SG2551	SPUL26471 – SPUL26521	

* Mapeado por Thomson et al. (2008), exceto as SPIs-11 e 12;

** *Loci* mapeados em SP RKS5078 devido a rearranjo em SP449/87;

*** “Operons” fimbriais com todos os genes funcionais em SP44/87 (análise *in silico*).

Apêndice B: Imagens das RODs que foram analisadas por PCR em todas as estirpes

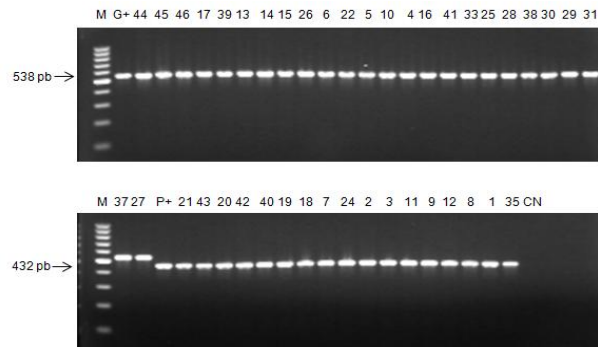


Figura B1. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD1. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

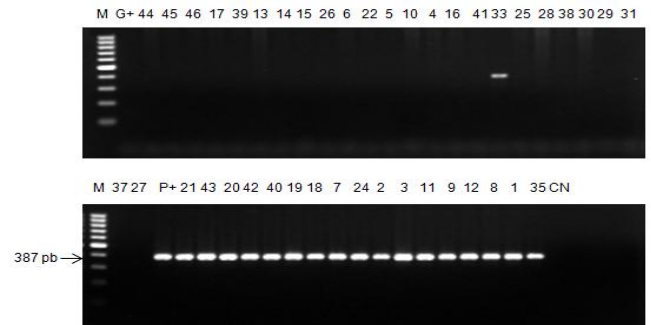


Figura B4. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD5. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

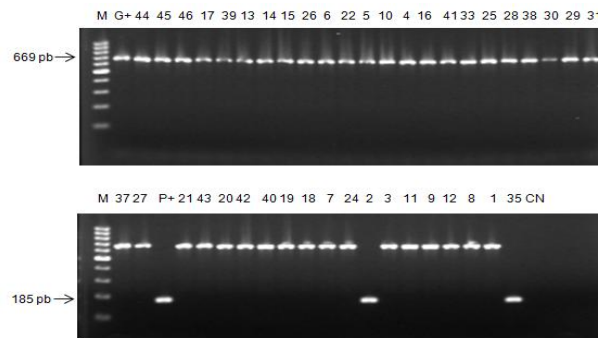


Figura B2. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD2. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

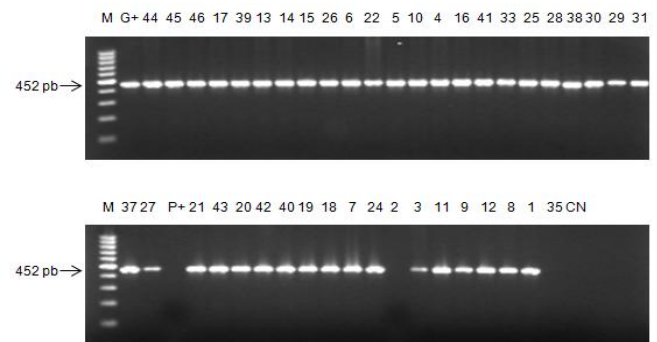


Figura B5. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD6. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

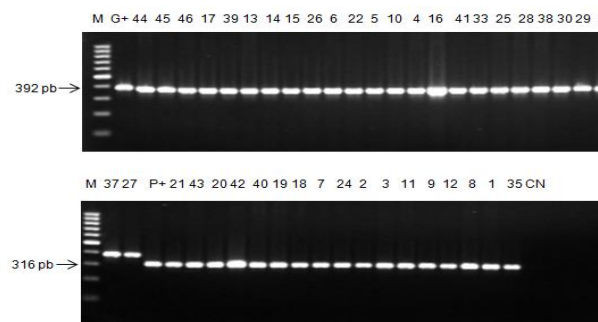


Figura B3. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD4. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

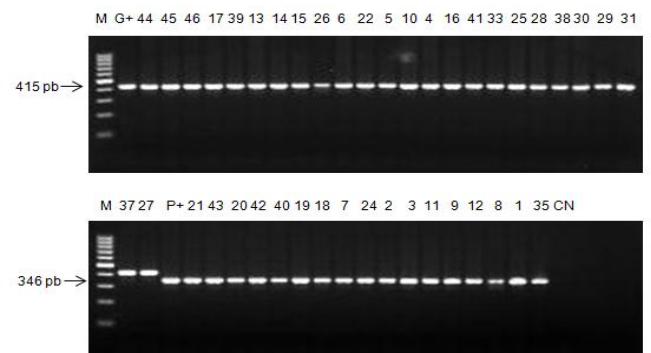


Figura B6. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD7. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

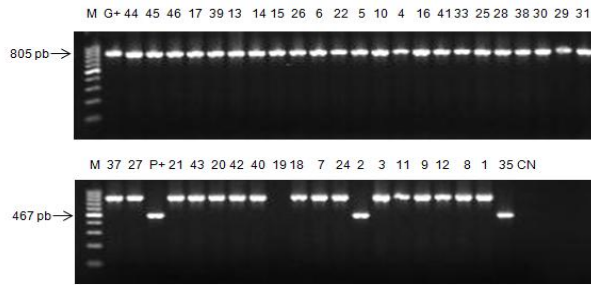


Figura B7. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD9. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

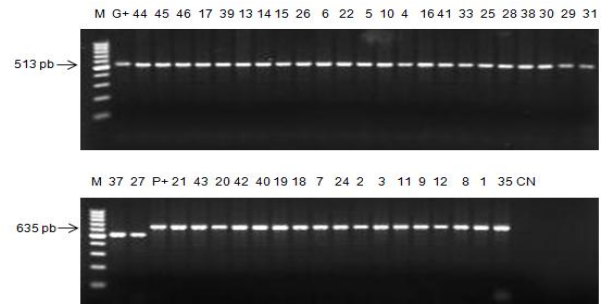


Figura B10. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD13. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

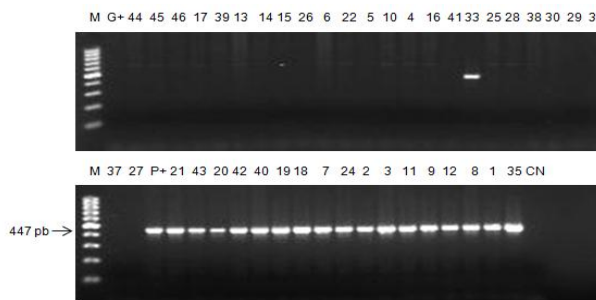


Figura B8. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD11. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

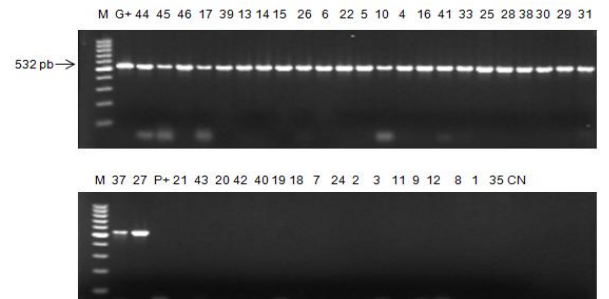


Figura B11. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD14.1. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

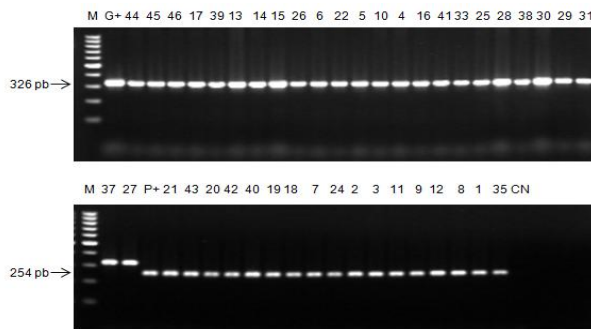


Figura B9. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD12. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

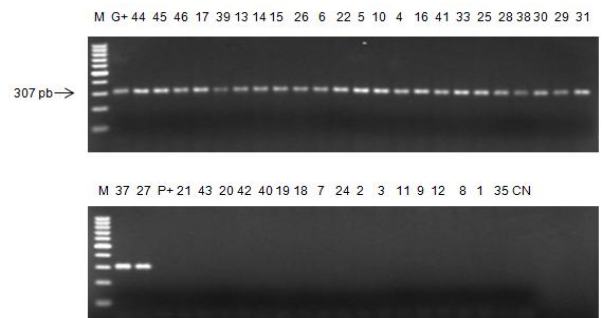


Figura B12. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD14.2. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

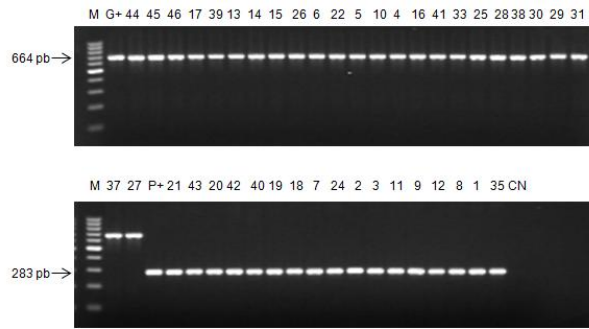


Figura B13. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD15. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

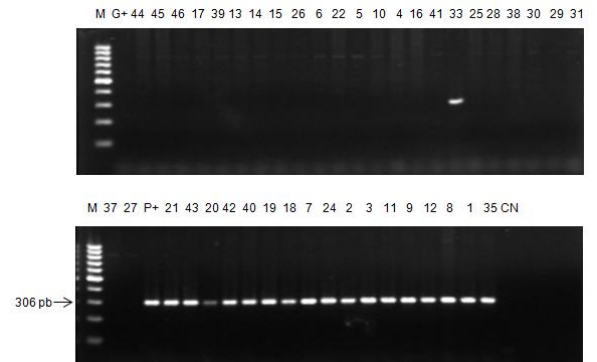


Figura B16. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD18. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

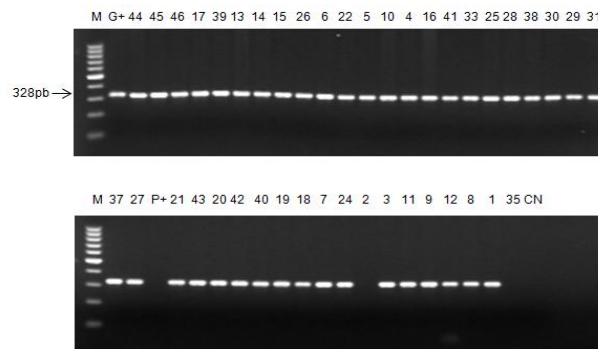


Figura B14. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD16. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

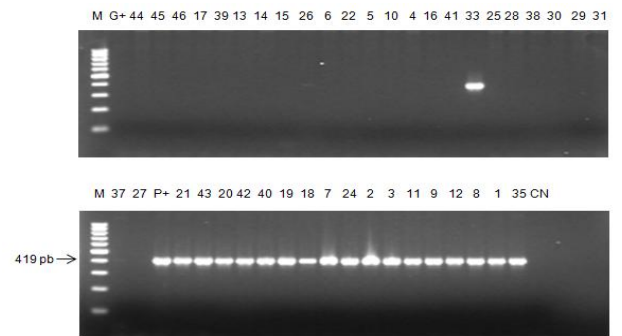


Figura B17. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD19. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

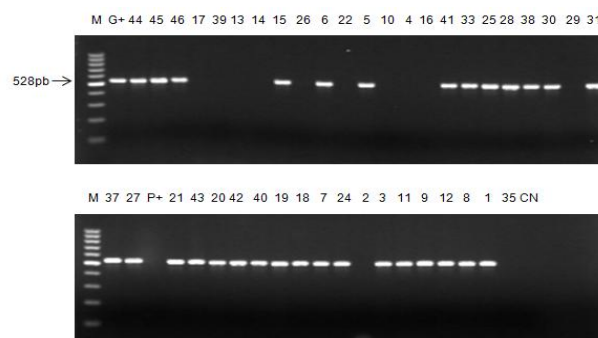


Figura B15. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD17. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

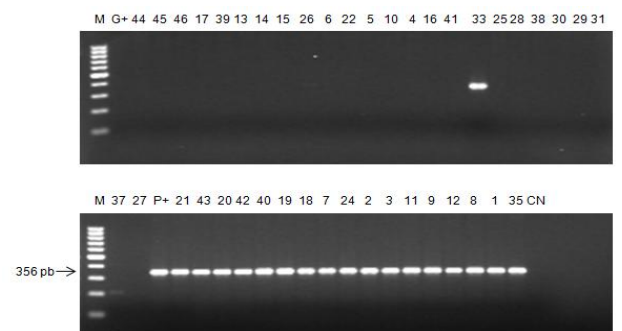


Figura B18. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD20. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

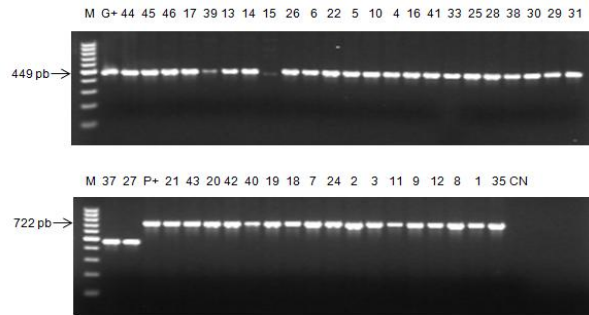


Figura B19. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD21. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

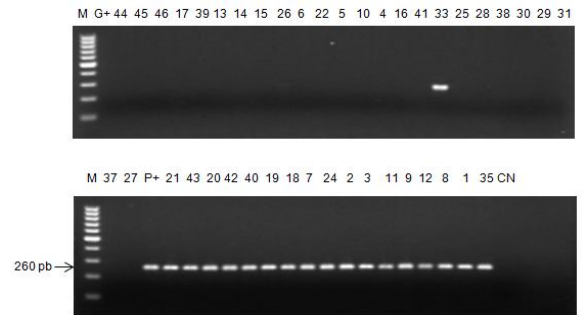


Figura B22. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD24. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

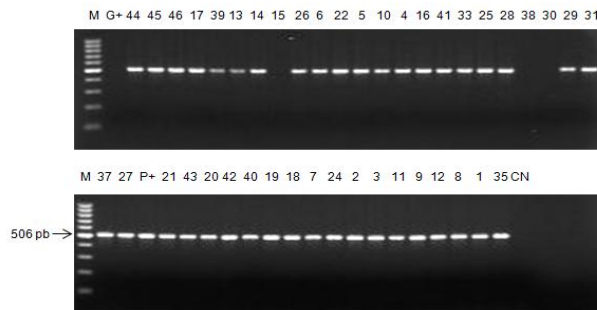


Figura B20. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD22. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

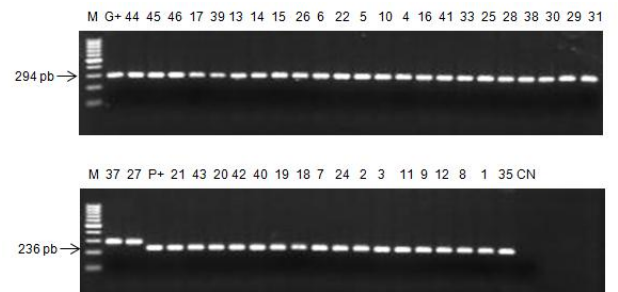


Figura B23. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD27. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

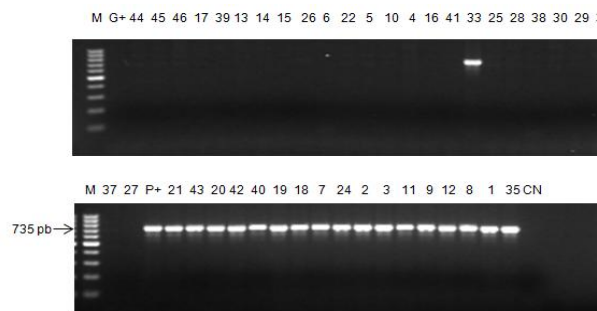


Figura B21. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD23. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

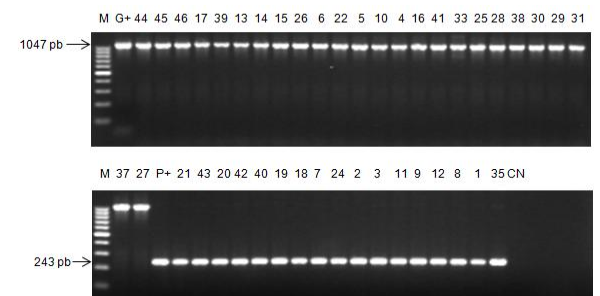


Figura B24. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD30. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

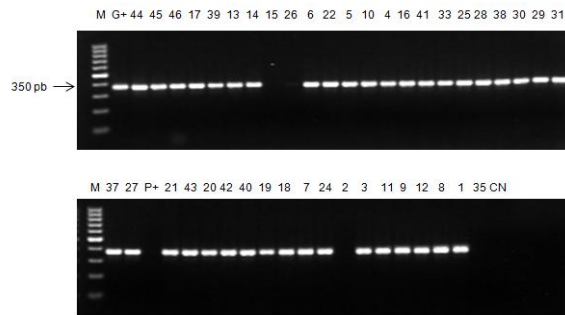


Figura B25. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD32. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

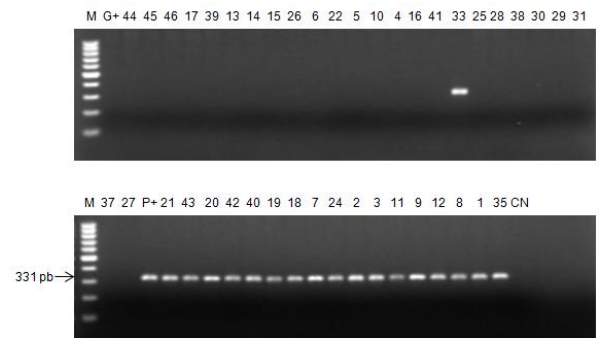


Figura B28. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD33(stdC). M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

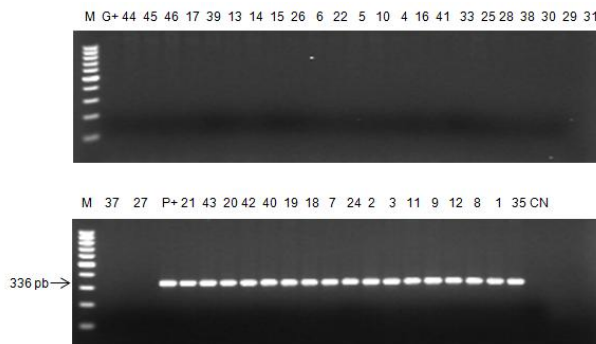


Figura B26. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD33(stdA). M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

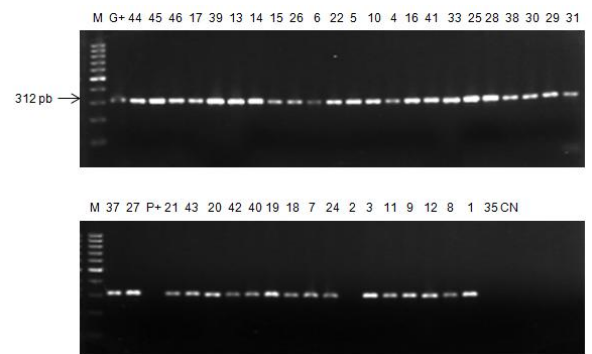


Figura B29. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD34. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

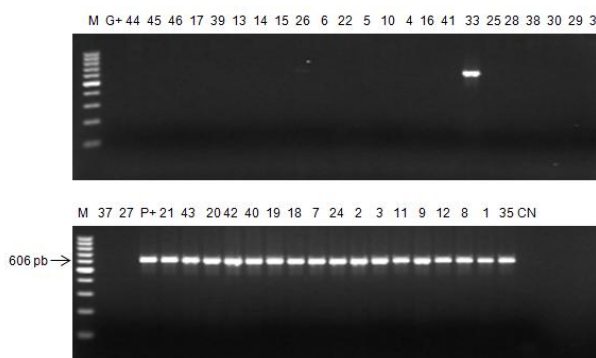


Figura B27. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD33(stdB). M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum* 449/87.

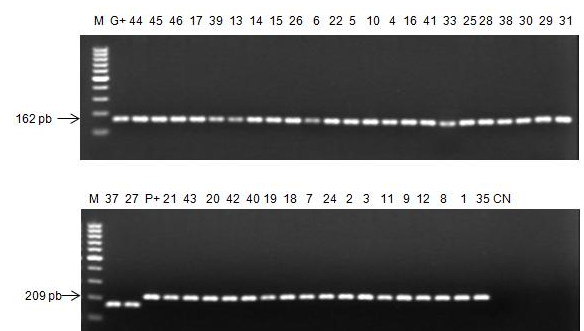


Figura B30. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD36. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

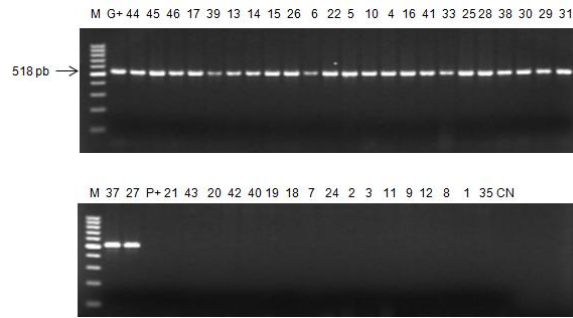


Figura B31. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD37. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

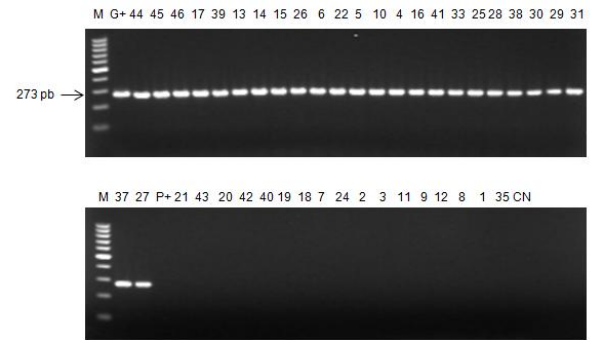


Figura B33. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD43. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*

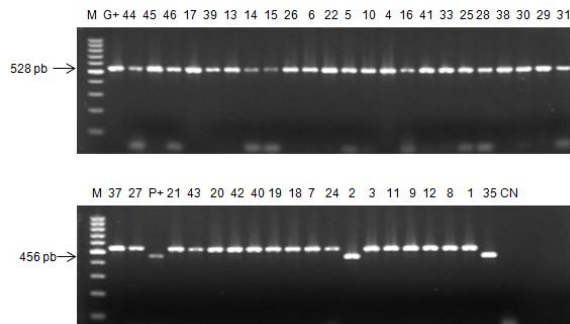


Figura B32. Teste de conservação em todas as estirpes para a ROD39. M: 100 pb (Fermentas, EUA). G+: *S. Gallinarum* 287/91; P+: *S. Pullorum*