BRUNA FARIAS ALVES

Diversidade genética de *Toxoplasma gondii* na Região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país

São Paulo

2021

BRUNA FARIAS ALVES

Diversidade genética de *Toxoplasma gondii* na Região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena

São Paulo

2021

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4145
FMVZ

Alves, Bruna Farias
Diversidade genética de *Toxoplasma gondii* na Região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país / Bruna Farias Alves. – 2021.
140 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena.

1. Genotipagem. 2. Isolamento. 3. Microssatélites. 4. PCR-RFLP. 5. Toxoplasmose. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diversidade genética de Toxoplasma gondii na região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país", protocolada sob o CEUA nº 6378010719 (ID 007036), sob a responsabilidade de **Hilda Fátima de Jesus Pena** *e equipe; Bruna Farias Alves* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 25/09/2019.

We certify that the proposal "Toxoplasma gondii genetic diversity in the Southern Region of Brazil and study of its population structure in the country", utilizing 600 Birds (males and females), 600 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 6378010719 (ID 007036), under the responsibility of **Hilda Fátima de Jesus Pena** *and team; Bruna Farias Alves* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/25/2019.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2019 a 09/2021 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem:	Animais de proprietários						
Espécie:	Aves	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	6 a 48 meses	N:	600
Linhagem:	Sem raça definida			Peso:	1 a 3 kg		
Origem:	Animais provenientes de estabelecimentos comerciais						
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	30 a 40 dias	N:	600
Linhagem:	Swiss			Peso:	15 a 30 g		

Local do experimento: Colheita de sangue, eutanásia e colheita de órgãos dos galináceos: nos locais de obtenção desses animais, nos municípios da região Sul. Bioensaio em camundongos: Laboratório de Doenças Parasitárias (FMVZ/USP)

São Paulo, 02 de novembro de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Bruna Farias

Título: **Diversidade genética de** *Toxoplasma gondii* **na Região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,
que me ensinaram a nunca desistir,
sem os quais nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre guiando meus passos e dando forças para que eu ultrapasse os desafios e alcance meus sonhos e objetivos.

À Dra. Hilda Fátima de Jesus Pena, minha orientadora, pelas várias horas de compartilhamento de ensinamentos, bancada, planilhas e correções e principalmente pela amizade e parceria que formamos, agradeço imensamente por essa oportunidade.

Ao Herbert, meu grande amigo e colaborador nesse trabalho, meu companheiro de coleta, de bioensaio e de vida. Agradeço por tornar os momentos de trabalho e de tensão mais leves com a tua presença e amizade.

À Ana e Yara, por toda a ajuda na execução do trabalho como também pela amizade, descontração e alívio da tensão nas horas críticas.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), em especial à Prof. Solange Maria Gennari, Prof. Arlei Marcili, Prof. Ricardo Augusto Dias e Marcos Amaku, que contribuíram diretamente com esse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Doenças Parasitárias, em especial ao Renato e ao Pedro, vocês são peças fundamentais para realização das nossas pesquisas.

A todos os funcionários do VPS pela ajuda e amizade durante a realização desse trabalho, em especial ao Danival, por sempre ter uma palavra amiga.

Ao meu amor, Bruno Feijó, pelo carinho, amor e apoio em todos os momentos e por acreditar na minha capacidade, algumas vezes, muito mais que eu mesma. A vida tem um sentido melhor ao seu lado!

A minha irmã, minha parceira de vida e grande amiga, sem o teu apoio incondicional e as palavras de encorajamento nas horas difíceis, não teria sido nada fácil.

Aos meus pais, Neuton e Rosane, que me ensinaram a dar valor a vida e a todas as oportunidades que ela oferece, que foram meu apoio incondicional durante essa jornada e fizeram com que a distância fosse um mero detalhe.

Aos meus amigos, de todos os momentos da vida, em especial aos que acompanharam essa trajetória e ajudaram a aliviar as tensões do doutorado com uma boa conversa e alguns litros de cerveja.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa Nº: 2018/26071-5.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo consentimento da bolsa de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.”

“"Os sonhos não determinam o lugar que você vai estar,
mas produzem a força necessária para o tirar do lugar em que está."
Augusto Cury

RESUMO

ALVES, B. F. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii* na Região Sul do Brasil e estudo da estrutura populacional do agente no país. 2021. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial. O Brasil apresenta um dos mais altos índices de soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em humanos do mundo e uma das mais altas diversidades genéticas do agente. As galinhas de vida livre, por seu hábito alimentar, são utilizadas para estudos de caracterização genotípica de isolados de *T. gondii* a fim de entender a estrutura populacional do parasita e suas características biológicas em diferentes regiões do mundo. O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* de galinhas caipiras na Região Sul do Brasil utilizando o Teste de Aglutinação Modificado (MAT, título ≥ 10), isolar o parasita por meio de bioensaio em camundongos, e caracterizar os isolados de *T. gondii* genotipicamente por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP, 11 marcadores) e análise de Microssatélites (MS, 15 marcadores). Amostras de soro de 607 galinhas caipiras de 61 municípios da Região Sul foram testadas. Anticorpos anti-*T. gondii* foram encontrados em 54,9% (333/607) das galinhas, sendo observada uma frequência de ocorrência de 51,4% (110/214), 52,1% (100/192) e 61,2% (123/201) nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. Foi realizado o bioensaio em camundongos com os tecidos das galinhas com títulos ≥ 20 no MAT (304 aves), sendo obtidos 160 isolados (69 do Paraná, 39 de Santa Catarina e 52 do Rio Grande do Sul). A genotipagem PCR-RFLP completa foi obtida de 158 isolados de *T. gondii* revelando 41 genótipos (20 no Paraná, 17 em Santa Catarina e 22 no Rio Grande do Sul). Os Tipos clonais clássicos I, II e III (nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul), e as linhagens de ampla distribuição no Brasil (Tipos BrI, BrII e BrIII) foram observados. Dos demais genótipos encontrados, 18 já foram descritos anteriormente em diferentes Regiões do Brasil e 17 foram genótipos inéditos. A genotipagem por MS foi possível em 158 isolados de *T. gondii.* Examinando os oito marcadores de tipagem, foram identificados 60 tipos genéticos, porém, observando o conjunto dos 15 marcadores, um total de 118 genótipos foi revelado e 40 representaram clones.

No estado do Paraná, foram identificados 24 tipos e 53 genótipos (16 clones); em Santa Catarina foram observados 18 tipos, sendo 26 genótipos (13 clones), e, no Rio Grande do Sul, 30 tipos e 39 genótipos (11 clones). Foi identificada tipagem correspondente aos tipos clonais I variante, II e III, além dos tipos não-arquétipos África1, Caribe1, e América do Sul1,2, 3,4, e os demais isolados foram identificados também como não-arquétipos, considerando os oito marcadores de tipagem. O estudo corrobora a alta diversidade de *T. gondii* no Brasil.

Palavras-chave: Genotipagem. Isolamento. Microssatélites. PCR-RFLP. Toxoplasmose

ABSTRACT

ALVES, B. F. *Toxoplasma gondii* **genetic diversity in the South region of Brazil and study of its population structure in the country**. 2021. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Toxoplasmosis is a worldwide distributed zoonosis. Brazil has one of the highest seroprevalence rates of *Toxoplasma gondii* in humans in the world, and one of the highest genetic diversities of the agent. Free-range chickens, because they feed on the ground, have been used in studies of genotypic characterization of *T. gondii* isolates to understand the population structure of the parasite and its biological characteristics in different regions of the world. The present study aimed to determine the frequency of occurrence of anti-*T. gondii* antibodies from free-range chickens in the South region of Brazil using the Modified Agglutination Test (MAT, titer ≥ 10), to isolate the parasite by mouse bioassay, and genotypically characterize the *T. gondii* isolates by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP, 11 markers) and Microsatellite analysis (MS, 15 markers). Serum samples from 607 free-range chickens from 61 municipalities were evaluated. Antibodies anti-*T. gondii* were found in 54.9% (333/607) of the chickens, with a frequency of occurrence of 51.4% (110/214), 52.1% (100/192), and 61.2% (123/ 201) in the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, respectively. The bioassay in mice was performed with the tissues of chickens with titers ≥ 20 in the MAT (304 birds) and 160 isolates were obtained (69 from Paraná state, 39 from Santa Catarina state and 52 from Rio Grande do Sul state). Complete PCR-RFLP genotyping was obtained from 158 *T. gondii* isolates revealing 48 genotypes (20 from Paraná, 17 from Santa Catarina and 22 from Rio Grande do Sul states). The classic clonal Types I, II and III (from the Santa Catarina and Rio Grande do Sul states), and the lineages widely distributed in Brazil (Types BrI, BrII and BrIII) were observed. Of the other genotypes found, 19 were previously described in different regions of Brazil and 17 were new genotypes. Genotyping by MS was possible in 158 *T. gondii* isolates. Examining the eight typing markers, 60 genetic types were identified, however, searching the set of 15 markers, a total of 118 genotypes were revealed and 40 represented clones. In Paraná state, 24 types and 53 genotypes (16 clones) were identified; in Santa Catarina, 18 types were observed, corresponding to 26 genotypes (13 clones), and,

in Rio Grande do Sul, 30 types and 39 genotypes (11 clones). Typing corresponding to clonal types I variant, II and III was identified, in addition to non-archetypal types: Africa 1, Caribbean1, and South America1,2,3,4, and the other isolates were also identified as non-archetypes, considering the eight typing markers. The study corroborates the high diversity of *T. gondii* in Brazil.

Keywords: Genotyping. Isolation. Microsatellites. PCR-RFLP. Toxoplasmosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da Região Sul do Brasil de acordo com os valores de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de cada município e definição dos locais de campanha, enfatizando as principais rodovias de acesso 28
Figura 2 - Mapa da Região Sul do Brasil realçando os municípios em que foram captadas as galinhas caipiras nas três campanhas 41
Figura 3 - Mapa da Região Sul do Brasil demarcando os pontos em que foram captadas as galinhas caipiras nas três campanhas, ressaltando as rodovias principais em que foi realizado o deslocamento 42
Figura 4 - Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) nos três estados da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) 47
Figura 5 - Pontos de colheita das galinhas caipiras no estado do Paraná e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente. 48
Figura 6 - Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado do Paraná.....50
Figura 7 - Pontos de colheita das galinhas no estado de Santa Catarina e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente. 51
Figura 8 - Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado de Santa Catarina 52
Figura 9 - Pontos de colheita das galinhas no estado do Rio Grande do Sul e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente. 53
Figura 10 - Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado do Rio Grande do Sul 55
Figura 11 - Mapa da Região Sul do Brasil com gráficos representando, por município de colheita das galinhas caipiras, o sucesso no isolamento de *Toxoplasma gondii.* O

tamanho do gráfico corresponde ao número de galinhas caipiras soropositivas nas quais foram realizados os bioensaios em camundongos. 56
Figura 12 - Mapa da Região Sul do Brasil com gráficos representando, por município de colheita das galinhas caipiras, o resultado da genotipagem por PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) dos isolados de *Toxoplasma gondii*, segundo a classificação do genótipo. O tamanho do gráfico corresponde ao número de isolados. 66
Figura 13 - Rede filogenética de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas caipiras dos estados da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) utilizando dados de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP). Como referência, são representados os tipos clonais clássicos I, II e III, os tipos clonais brasileiros BrI, BrII e BrIII e o genótipo #13. O círculo azul destaca um cluster de amostras próximas aos Tipos III e BrIII. Os círculos vermelhos destacam clusters de amostras não-arquétipas divergentes dos tipos clássicos...68
Figura 14 - Análise por rede filogenética de *Toxoplasma gondii* no Brasil, usando dados de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP). As amostras de referência Tipo I, Tipo II, Tipo II variante, Tipo III, Tipo BrI, Tipo BrII, Tipo BrIII, Tipo BrIV e #13 estão em negrito. Os números representam a identificação do genótipo PCR-RFLP. A circulação respectiva das amostras nas regiões do Brasil está indicada por: N=Norte; NE=Nordeste; CO=Centro-Oeste; NNE= Norte/Nordeste; SSE=Sul/Sudeste; Ci=circula em outras duas regiões ou mais de duas. Os círculos em vermelho e verde indicam os principais clusters formados e os círculos em azul destacam clusters secundários.....69
Figura 15 -Relação genealógica das amostras de *Toxoplasma gondii* das galinhas do Rio Grande do Sul usando resultados da análise de Microssatélites. Os números representam a identidade das galinhas. ENT, ME-49 e NED são amostras de referência dos tipos clonais I, II e III. PR=Paraná (cor roxa), SC=Santa Catarina (cor verde) e RS=Rio Grande do Sul (cor roxa). O círculo azul corresponde às amostras do Tipo América do Sul 4, que formaram um único cluster.. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado do Paraná e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município 43

Tabela 2 - Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado de Santa Catarina e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município.....44

Tabela 3 - Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado do Rio Grande do Sul e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município. 45

Tabela 4 - Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) das galinhas caipiras captadas na Região Sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul)..46

Tabela 5 - Títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Teste de Aglutinação Modificado – MAT) em galinhas caipiras da Região Sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), segundo o número de galinhas, número de bioensaios em camundongos e o número de isolados de T. gondii obtidos.....47

Tabela 6 - Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio de bioensaio em camundongos das galinhas caipiras captadas no estado do Paraná, segundo o município de colheita.....49

Tabela 7 - Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio de bioensaio em camundongos das galinhas captadas no estado de Santa Catarina, segundo o município de colheita.....52

Tabela 8 - Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio do bioensaio em camundongos das galinhas caipiras captadas no estado do Rio Grande do Sul, segundo o município de colheita.....54

Tabela 9 - Número total de galinhas, número de galinhas soropositivas, número de bioensaios e de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos nos estados da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) 57

Tabela 10 - Genotipagem de cepas de *Toxoplasma gondii* isoladas de galinhas caipiras dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, por meio da PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) 58
Tabela 11 - Total de amostras genotipadas, número de genótipos e hospedeiro de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) identificados em amostras brasileiras da Região Sul após os resultados do presente estudo. 70
Tabela 12 - Genótipos compartilhados entre as regiões geográficas do Brasil, obtidos por meio da PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP)..... 71
Tabela 13 - Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul por meio da análise de Microssatélites e indicação do genótipo PCR-RFLP correspondente para comparação da identidade dos genótipos 73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Total de amostras genotipadas, número de genótipos e hospedeiro de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) identificados em amostras brasileiras, segundo o estado e região.....22

Quadro 2 - Total de genótipos obtidos por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) de *Toxoplasma gondii* identificados em amostras brasileiras, segundo a Região.....24

Quadro 3 - Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados na PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) para genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras provenientes da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) 34

Quadro 4 - Genotipagem multilocal das amostras arquétipas Tipos I, II e III e das amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controles positivos na PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP).....35

Quadro 5 - Informações referentes aos marcadores genéticos utilizados na PCR para genotipagem por meio da análise de Microssatélites*, de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras provenientes da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) 37

Quadro 6 - Genotipagem* por meio da análise de Microssatélites** de amostras arquétipas de *Toxoplasma gondii*.....38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 JUSTIFICATIVA 25

3 OBJETIVOS 26

4 MATERIAL E MÉTODOS 27

4.1. LOCAIS DE COLHEITA DE AMOSTRAS 27

4.1.1. Critérios de inclusão das propriedades 29

4.2 OBTENÇÃO DAS GALINHAS CAIPIRAS 29

4.2.1. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* 30

4.3. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS 30

4.3.1. Digestão péptica dos tecidos das galinhas 30

4.3.2. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em camundongos 31

4.4. ANÁLISE MOLECULAR 32

4.4.1. Extração de DNA 32

4.4.2. PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de *Toxoplasma gondii* 33

4.4.3. Análise de Microssatélites de *Toxoplasma gondii* 36

4.5. ANÁLISE DE DADOS 39

4.5.1. Genotipagem 39

4.5.2. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii* 39

4.5.3. Estatística 40

5 RESULTADOS 41

5.1. SORODIAGNÓSTICO 42

5.2. ISOLAMENTO DE *TOXOPLASMA GONDII* 46

5.3. CARACTERIZAÇÃO GENÓTIPICA DE *TOXOPLASMA GONDII* POR PCR-RFLP 57

5.4. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *TOXOPLASMA GONDII* POR MS 72

6 DISCUSSÃO 85

7 CONCLUSÕES 92

REFERÊNCIAS 93

ANEXOS 99

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, que acomete uma diversidade de mamíferos e aves, incluindo o homem, caracterizando seu potencial zoonótico. Os felinos domésticos e silvestres são os hospedeiros definitivos, sendo o gato (*Felis catus domesticus*) o principal. Os hospedeiros susceptíveis podem se infectar por *T. gondii* por meio das seguintes formas primárias: transmissão transplacentária de taquizoítas, ingestão de tecidos de animais contendo cistos infectantes e ingestão de água e alimentos contaminados com fezes de felídeos contendo oocistos esporulados (DUBEY, 2010).

Toxoplasma gondii pode causar inúmeros prejuízos à saúde humana e a diversas outras classes de animais, e os sistemas neurológico e reprodutivo são os mais afetados nos hospedeiros infectados (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Existe uma estimativa de que até um terço da população humana já tenha sido exposta a esse parasita e esteja cronicamente infectada. No Brasil, este protozoário está amplamente difundido, e o país apresenta um dos mais altos índices de soroprevalência em humanos do mundo (GILBERT et al., 2008; DUBEY, 2010). É importante o sorodiagnóstico entre animais de produção, devido à sinalização da contaminação do espaço rural, pois estes animais estão em contato direto com o meio ambiente por longos períodos (BONNA et al., 2006) e servem de alimento para a população humana.

Existe um grande interesse na investigação molecular de genótipos de *T. gondii* provenientes de infecções em animais e humanos, com intuito de verificar, particularmente, a correlação entre a variante encontrada e as propriedades biológicas desta variante, bem como rastrear epidemiologicamente o agente para a identificação de fontes de infecção ou vias de transmissão (OWEN; TREES, 1999).

Em galinhas, a toxoplasmose apresenta predominantemente a forma subclínica, apresentando pouca importância clínica para essa espécie (DUBEY et al., 2007b, 2020). As galinhas de criações domésticas são consideradas importantes na epidemiologia desta doença, pois são fontes de transmissão tanto para o homem quanto para o gato, favorecendo, por meio deste último, a disseminação da doença pela eliminação de oocistos no meio ambiente (DUBEY et al., 2020). As galinhas de vida livre têm sido amplamente utilizadas para rastrear indiretamente a contaminação ambiental com oocistos de *T. gondii* devido ao seu hábito de se

alimentarem diretamente no solo. Este rastreamento envolve tanto o estudo de soroprevalência de *T. gondii* como a caracterização genotípica de isolados a fim de entender a estrutura populacional do parasita em diferentes regiões do mundo e suas características biológicas (SHWAB et al., 2014).

No Brasil, estudos de soroprevalência apontam que as galinhas de criação doméstica têm alto índice de positividade para *T. gondii*. De Oliveira et al. (2009) verificaram 53,3% de animais soropositivos nos estados do Nordeste, exceto na Paraíba, que não participou desse estudo; Dubey et al. (2007b) observaram 38% de soropositividade em galinhas provenientes do Rio Grande do Sul. Mais recentemente, Trevisani et al. (2017) relataram 63,7% de animais soropositivos em cinco mesorregiões de Santa Catarina e Vieira et al. (2018) relataram 16,6% de galinhas soropositivas na região nordeste do Paraná. Alguns trabalhos relatam alto índice de isolamento de *T. gondii* dos tecidos de galinhas caipiras, como Dubey et al. (2006) que conseguiram isolar este protozoário de 72,7% de animais soropositivos em um estudo conduzido no estado do Amazonas, Beltrame et al. (2012) obtiveram um índice de isolamento de 75% em galinhas do Espírito Santo e Feitosa et al. (2016) isolaram *T. gondii* de 46,5% dos animais soropositivos na Paraíba. Isso demonstra que os animais tinham cistos viáveis capazes de infectar humanos e animais.

Os primeiros estudos genotípicos com amostras da Europa e América do Norte classificaram os isolados de *T. gondii* em três linhagens clonais clássicas ou arquétipas denominadas tipos I, II e III quando analisados por meio do polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA gerados por enzimas de restrição (RFLP) e por marcadores de microssatélites (MS) (HOWE; SIBLEY, 1995; HOWE et al., 1997; AJZENBERG et al., 2002). Mas, posteriormente, com o desenvolvimento de novos marcadores e ampliação dos estudos para outras regiões e diferentes hospedeiros, revelou-se que, ao contrário do que ocorre na Europa e América do Norte, onde há predominância dos tipos II e III, os isolados da América do Sul são altamente diversos (AJZENBERG et al., 2004; KHAN et al., 2006; PENA et al., 2006).

Esta diversidade das amostras sul-americanas de *T. gondii* pode estar relacionada com a alta ocorrência de toxoplasmose ocular e congênita severas, particularmente no Brasil, Argentina e Colômbia (GILBERT et al., 2008; DE-LA-TORRE; LÓPEZ-CASTILLO; GÓMEZ-MARÍN, 2009; RUDZINSKI et al., 2016). O

município de Erechim, no Rio Grande do Sul, tem uma prevalência muito alta e pouco usual de toxoplasmose ocular (GLASNER et al., 1992).

No Brasil, algumas linhagens têm ampla distribuição e são consideradas clonais, sendo designadas tipos BrI, BrII e BrIII (PENA et al., 2008), com ocorrência baixa das clonais clássicas. A linhagem tipo BrIV (PENA et al., 2008), até o momento, só foi encontrada na Região Sul e, recentemente, na Região Sudeste do país, e parece ser uma linhagem de circulação local, necessitando do estudo de maior número de amostras nesta região para verificar esta característica, assim como o genótipo denominado como #13 parece ser uma linhagem de circulação local na região Nordeste do país (FEITOSA et al., 2017).

Em uma revisão realizada por Shwab et al. (2014) com isolados obtidos em todos os continentes, pode-se observar que o Brasil é um dos países que possui a maior quantidade de isolados de *T. gondii* genotipados pela PCR-RFLP, isso se deve à grande extensão de área do país e ao interesse dos grupos de pesquisadevido à patogenicidade dos isolados brasileiros, que parecem ser biologicamente diferentes por apresentarem maior virulência para camundongos. A compreensão da estrutura populacional é de grande interesse e pode trazer informações referentes à transmissão e evolução desse parasita, bem como à sua dispersão zoonótica. No Quadro 1, pode ser visualizado os dados das amostras de *T. gondii* genotipadas por meio de PCR-RFLP no Brasil, de acordo com a cidade e região em que foram descritas.

É importante observar que uma proporção considerável de genótipos PCR-RFLP no Brasil tem isolados múltiplos como consequência da clonalidade epidêmica. Assim, pode-se dizer que a tipagem genética baseada na PCR-RFLP precisa ser usada com cautela em inferências epidemiológicas relacionadas às infecções por *T. gondii*. É altamente desejável usar marcadores com alto poder discriminatório para estudos epidemiológicos no qual o objetivo é rastrear a origem da infecção e/ou os mecanismos de transmissão do patógeno.

Quadro 1 – Total de amostras brasileiras de *Toxoplasma gondii* genotipadas por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP), segundo a região, estado e hospedeiro.

Região	Estado	Nº amostras genotipadas	Nº de genótipos	Hospedeiro
Centro-oeste	Mato Grosso	45	17	Galinha
		9	8	Cão
		1	1	Gato
		2	2	Humano
		9	6	Silvestre
	Mato Grosso do Sul	21	11	Galinha
	TOTAL	**87**	**45**	
Nordeste	Alagoas	7	5	Galinha
	Bahia	21	9	Galinha
	Ceará	6	5	Galinha
	Fernando de Noronha	24	6	Galinha
		2	1	Garça
		3	2	Gato
		1	1	Ovino
		3	3	Roedor
		1	1	Suíno
	Maranhão	7	5	Galinha
	Paraíba	29	9	Galinha
	Paraíba	19	13	Suíno
	Pernambuco	2	2	Galinha
		6	4	Silvestre
	Rio Grande do Norte	11	4	Galinha
		3	3	Caprino
		1	1	Equídeo
		5	5	Suíno
	Sergipe	1	1	Galinha
	TOTAL	**152**	**80**	
Norte	Amazonas	2	2	Galinha
	Pará	14	10	Galinha
		11	8	Silvestre
	Rondônia	20	6	Galinha
	TOTAL	**47**	**26**	
Sudeste	Espírito Santo	49	12	Galinha
		1	1	Silvestre
	Minas Gerais	15	8	Galinha
		8	6	Cão
		2	2	Coelho
		28	15	Homem
		15	7	Silvestre
	Rio de Janeiro	56	22	Galinha
	São Paulo	17	11	Galinha
		1	1	Avestruz
		9	3	Caprino
		20	12	Cão
		44	20	Gato
		15	4	Humano
		24	12	Ovino
		1	1	Roedor
		45	21	Silvestre
	TOTAL	**350**	**158**	
Sul	Paraná	24	14	Galinha
		27	12	Gato
		4	2	Humano
		9	5	Pomba

	6	3	Roedor
Santa Catarina	11	7	Galinha
	2	1	Bovino
	1	1	Gato
Rio Grande do Sul	27	13	Galinha
	1	1	Coelho
	1	1	Equino
	2	2	Silvestre
	2	1	Humano
	1	1	Perdiz
	7	5	Ovino
	3	1	Suíno
TOTAL	**128**	**70**	
TOTAL BRASIL	**764**	**183**	

Fonte: Alves (2021).

Os resultados obtidos com marcadores MS para a genotipagem multilocal de isolados de *T. gondii* sugerem que esses marcadores têm um nível de resolução superior à da PCR-RFLP. Ajzenberg et al. (2002) encontraram 3-16 alelos em uma população de 83 amostras de *T. gondii* usando marcadores MS, ao passo que apenas 2-4 alelos são tipicamente encontrados em cada lócus com a genotipagem por PCR-RFLP. Microssatélites representam outra classe de marcadores genéticos que consistem em pequenas sequências repetitivas de dois a seis nucleotídeos (SSR). Os marcadores originados dessas repetições são altamente polimórficos devido à variação no comprimento das repetições, consequentemente apresentando múltiplos alelos, o que os torna muito informativos para estudos genéticos, filogenéticos e epidemiológicos. Para reconstruções da história evolutiva, a PCR-RFLP pode ser aplicada de maneira eficiente, mas não para resolver de maneira confiável importantes questões epidemiológicas como a diversidade de amostras e grupos, existência de subpopulações geográficas e a ocorrência de fluxo gênico entre duas populações.

Em quase vinte anos de estudos em que diferentes grupos de pesquisa caracterizaram genotipicamente os isolados e amostras primárias de *T. gondii* de diferentes espécies hospedeiras do Brasil, podemos observar, resumidamente, a situação epidemiológica molecular atual no Quadro 2 (levantamento pessoal). Há 10 anos, Pena et al. (2008a) estudaram a estrutura populacional do agente utilizando dados de PCR-RFLP de 125 isolados, em grande parte provenientes da Região Sudeste do país, e descreveram 48 genótipos. Atualizando todos os dados publicados no Brasil (levantamento pessoal), há resultados de genotipagem por meio de PCR-RFLP referentes a 764 amostras de *T. gondii*, a maioria de isolados,

correspondendo a 184 genótipos. Destaca-se que, destas 764 amostras, apenas 28 (3,6%) apresentam os genótipos clássicos I, II e III e, apenas na Região Sul, estes três tipos clonais foram descritos. Os demais genótipos são chamados geralmente de "atípicos", embora sejam eles que correspondam às amostras típicas no território brasileiro.

Quadro 2 – Total de genótipos obtidos por meio de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) de *Toxoplasma gondii* identificados em amostras brasileiras, segundo a Região.

			Linhagens clonais		
Região	Total de amostras	Total de genótipos	I	II	III
Centro-Oeste	87	30	0	0	1
Norte	47	25	0	0	0
Sul	128	48	3	9	3
Nordeste	152	40	0	7	1
Sudeste	350	89	0	1	9
Total	764	183	3	17	8

Fonte: Alves (2021).

Na Região Norte, um estudo amplo está sendo finalizado (comunicação pessoal) para adicionar dados que serão importantes para compreensão da estrutura do parasita no território nacional, uma vez que ainda é uma região com número reduzido de amostras estudadas, mas importante por apresentar características de urbanização diferentes. Até o momento, um total de 117 isolados desta região foram genotipados por PCR-RFLP e nenhum isolado foi identificado como tipo clonal I, II ou III (dados ainda não publicados).

Na Região Nordeste, os tipos clonais II e III encontrados se referem a isolados da ilha de Fernando de Noronha (DUBEY et al., 2010; SHWAB et al., 2014; SILVA et al., 2017), o que torna a circulação dos tipos clonais bastante rara na parte continental brasileira.

Para um entendimento melhor da epidemiologia molecular de *T. gondii* na Região Sul, é necessário avaliar a estrutura populacional por meio da análise genotípica de um número maior de amostras dos três estados que compõem esta Região, com isso, torna-se necessária a realização de ensaios para a tentativa de isolamento do parasita e avaliação do impacto da circulação dos três tipos clonais na Região Sul.

2 JUSTIFICATIVA

Em virtude da carência de informações sobre os tipos biológicos e genotípicos de *T. gondii* na Região Sul do Brasil e sabendo-se que galinhas caipiras, por seu hábito alimentar, são consideradas a espécie animal doméstica mais eficiente para obter isolados de *T. gondii* representativos de uma determinada região, o presente estudo contribuirá para o conhecimento da estrutura populacional de *T. gondii* no país, uma vez que, atualmente, a maior parte dos estudos foi realizada nas regiões Sudeste e Nordeste.

3 OBJETIVOS

- Determinar a frequência de ocorrência de anticorpos anti-*T. gondii* em galinhas caipiras na Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).
- Isolar *T. gondii* de tecidos de galinhas caipiras da Região Sul.
- Caracterizar, genotipicamente, as amostras de *T. gondii* isoladas de galinhas caipiras da Região Sul, utilizando marcadores PCR-RFLP e MS.
- Comparar os resultados deste estudo com os dados disponíveis de genotipagem PCR-RFLP de isolados de *T. gondii* de outras regiões do Brasil, em termos de diversidade e estrutura populacional do agente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAIS DE COLHEITA DE AMOSTRAS

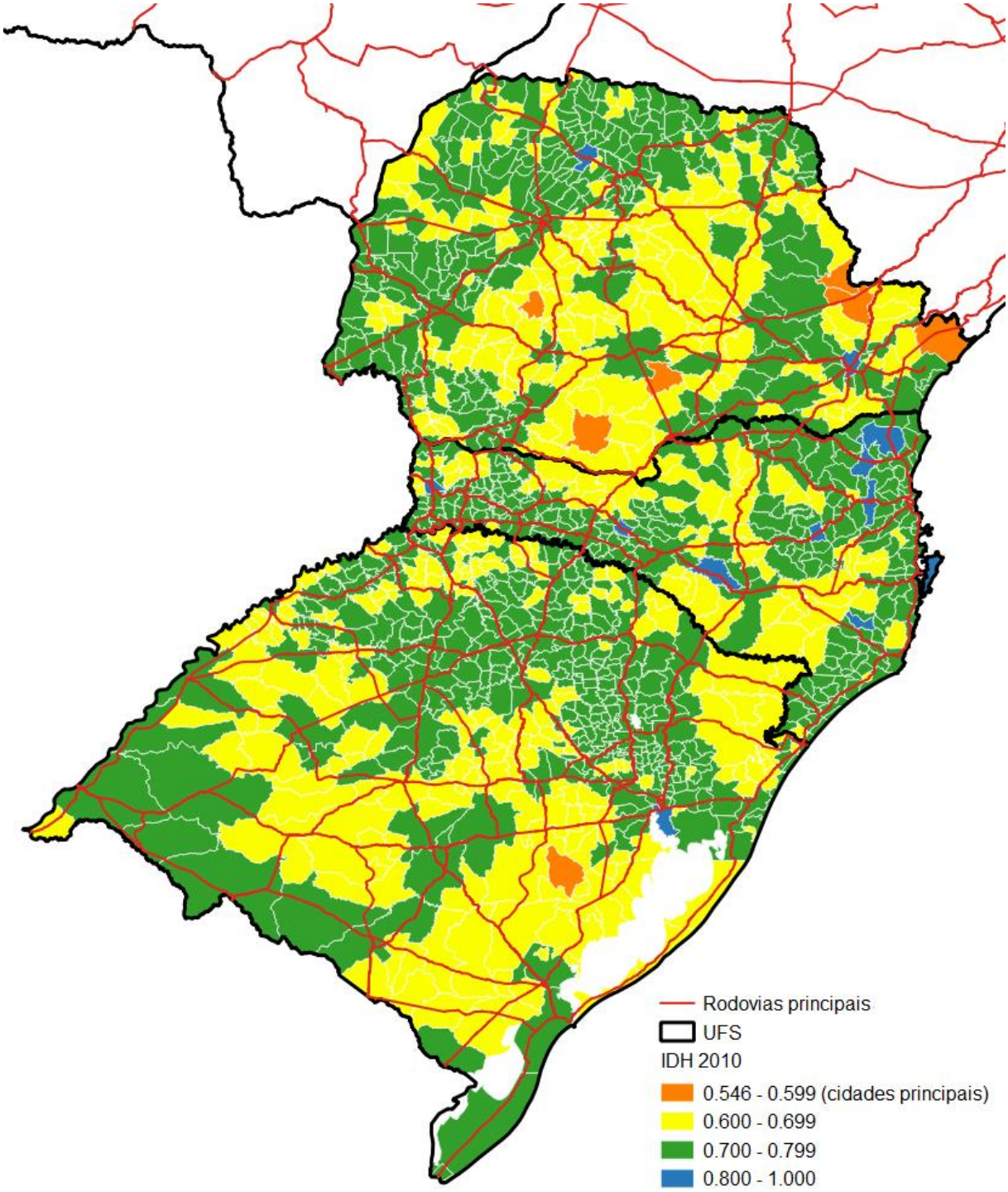
Para a seleção das áreas de colheita de amostras nos três estados da Região Sul do Brasil (Paraná-PR, Santa Catarina-SC e Rio Grande do Sul-RS), o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) dos municípios foi utilizado como critério, sendo definidas seis cidades principais, caracterizadas por terem IDH entre 0,546 e 0,599: Cerro Azul/PR, Guaraqueçaba/PR, Laranjal/PR, Inácio Martins/PR, Coronel Domingos Soares/PR e Dom Feliciano/RS (Figura 1). A adoção deste critério baseou-se na hipótese de que nas áreas com menor IDH haveria maior probabilidade de serem encontradas criações de galinhas de vida livre (caipiras), uma vez que não havia cadastros oficiais de propriedades criadoras de aves em fundo de quintal. O trajeto para busca ativa dessas criações foi iniciado nos municípios de menor IDH, por estado, sendo percorridas as regiões adjacentes, incluindo os municípios com IDH entre 0,600 e 0,699.

Apesar da representação das principais rodovias na Figura 1, o deslocamento principal foi a partir de acessos secundários para encontrar propriedades que possuíam criações de galinhas caipiras. Foram realizadas colheitas de galinhas em todos os municípios em laranja (IDH 0,546 – 0,599), assim como em municípios em amarelo (IDH 0,600 – 0,699) (Figura 1). Ao chegar em uma das cidades principais, eram selecionadas as outras que seriam incluídas na pesquisa, e a área era percorrida para identificar as propriedades que possuíam galinhas caipiras e estavam dispostas a vender os animais e, assim, foram estabelecidos os parâmetros de colheita de cada área, que variaram de acordo com o número de propriedades que se encaixavam nos fatores de inclusão na área total de cada campanha. Nesse momento, também foi feito o primeiro contato com os proprietários das aves.

Foram realizadas três campanhas (uma por estado) e em cada uma foi realizada a colheita em pelo menos 20 municípios, sendo que era preconizada a captação de galinhas em pelo menos dois pontos de cada cidade. Em todas as campanhas, a distância entre as propriedades selecionadas foi de, no mínimo, 1km, diminuindo a chance de isolar amostras que poderiam ser clones circulantes e não amostras independentes, com a finalidade de obter maior diversidade dos isolados. Por este motivo, também foram colhidas amostras de, no máximo, cinco galinhas por

propriedade. Assim, foi possível maximizar e otimizar a busca por essas criações nas áreas programadas e, em última instância, o isolamento de *T. gondii*.

Figura 1 - Mapa da Região Sul do Brasil de acordo com os valores de Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de cada município e definição dos locais de campanha, enfatizando as principais rodovias de acesso.



Fonte: Alves (2021).

4.1.1. Critérios de inclusão das propriedades

A seleção de cada propriedade seguiu alguns critérios de inclusão:

- O proprietário concordava em vender pelo menos duas galinhas da propriedade;
- As galinhas deveriam ter acesso livre ao solo para alimentação;
- Distância mínima entre as propriedades de colheita de pelo menos 1km quando não era possível comprar cinco galinhas;
- Distância mínima entre as propriedades de colheita de pelo menos 10km quando era possível comprar cinco galinhas.

4.2 OBTENÇÃO DAS GALINHAS CAIPIRAS

O número de municípios e o número de galinhas incluídos no estudo foram estipulados com base na capacidade de processamento de amostras do laboratório por campanha (100 bioensaios de galinhas/campanha), a média de soroprevalência (~50%) e o sucesso de isolamento de *T. gondii* de galinhas soropositivas (~50%) observados previamente no Brasil (DUBEY et al., 2006a; BELTRAME et al., 2012; FEITOSA et al., 2016; TREVISANI et al., 2017). Além disso, para diminuir a possibilidade de isolados que poderiam representar clones da mesma cepa, foram colhidas amostras de no máximo cinco galinhas em cada propriedade. Inicialmente, estimou-se para cada campanha (uma por estado), a colheita em cerca de 40 propriedades localizadas em 20 municípios e 200 galinhas por estado, totalizando 600 galinhas nas três campanhas realizadas.

As aves eram abatidas no local de aquisição, seguindo-se a colheita de sangue, coração e cérebro. As amostras eram identificadas, acondicionadas individualmente e refrigeradas; as amostras de sangue eram mantidas em repouso para a separação do soro. Posteriormente, encaminhavam-se as amostras (via aérea ou rodoviária) ao setor de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (SP) para as análises laboratoriais.

4.2.1. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*

Os soros das galinhas caipiras foram testados para identificar a presença de anticorpos IgG anti-*T. gondii* por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) (DUBEY; DESMONTS, 1987).

Inicialmente, os soros eram diluídos em microplaca (96 poços), utilizando solução salina tamponada - pH 7,2 (NaCl 0,146M; NaH_2PO4 0,0026M; Na_2HPO4 0,008M) filtrada em membrana de policarbonato com 0,45µm de porosidade. Em seguida, 150µL de antígeno-estoque (taquizoítas inteiros fixados em formalina) eram diluídos em 2,5mL de solução alcalina tamponada - pH 8,95 (NaCl 0,12M; H_3BO_3 0,05mM; NaN_3 0,03M; albumina sérica bovina para uma solução de uso a 0,4%), 35µL de mercaptoetanol 0,2M e 50µL de Azul de Evans 0,2%. Essa mistura era homogeneizada e distribuída imediatamente em uma microplaca (96 poços) com fundo em “U”, resultando em 25µL de reagentes por poço.

Os soros eram transferidos para essa microplaca e misturados aos reagentes (v/v). A microplaca era selada com plástico adesivo para evitar evaporação e incubada durante a noite em estufa a 37ºC. A formação de um botão de contorno definido na base do poço da placa era anotada como resultado negativo e um carpete completo ou um véu de contorno pouco definido era anotado como positivo.

As aves com títulos ≥ 10 foram consideradas soropositivas (HAMIDINEJAT et al., 2014; RODRIGUES et al., 2019); posteriormente, eram realizadas diluições seriadas das amostras positivas na base 2, a partir de 1:10, até chegar ao título máximo de reação. Em todas as reações, foram usados controles positivo e negativo previamente conhecidos e controle do antígeno (apenas a mistura de reagentes). O antígeno foi gentilmente fornecido pelo Dr. J. P. Dubey do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, Beltsville, Maryland (USDA).

4.3. BIOENSAIO EM CAMUNDONGOS

4.3.1. Digestão péptica dos tecidos das galinhas

As aves com títulos de anticorpos anti-*T. gondii* ≥ 20 foram selecionadas para o bioensaio em camundongos e tiveram seus tecidos submetidos à digestão péptica para tentativa de isolamento de *T. gondii*.

O processamento foi realizado conforme descrito previamente por Dubey (1998). O coração de cada galinha era cortado, separadamente, em pequenos

fragmentos, com remoção da gordura e do tecido conjuntivo, e o cérebro respectivo adicionado. Então, o “pool” de tecidos era homogeneizado em solução de NaCl 0,85% (salina) com o auxílio de um homogeneizador doméstico. Ao homogeneizado, era acrescida pepsina ácida (recém-preparada e aquecida a 37ºC) - pH 1,1-1,2 (pepsina, 2,6g; NaCl, 5,0g; HCl, 7,0mL; água pura tipo III suficiente para 500mL de solução). Após incubação a 37ºC por uma hora em banho-maria com agitação, a suspensão era coada através de gaze e transferida para tubos cônicos de 50mL e centrifugada a 1.500 × *g* por 10 minutos. O sobrenadante era desprezado e o sedimento de cada tubo neutralizado com solução recém-preparada de bicarbonato de sódio a 1,2% - pH~8,3. Após, os sedimentos eram homogeneizados e transferidos para um único tubo cônico, o volume completado para 50mL com solução salina e a suspensão centrifugada a 1.500 × *g* por 10 minutos. O sobrenadante era então novamente desprezado, adicionava-se antibiótico (2.000U de penicilina + 200µg de estreptomicina/mL) ao sedimento, que era homogeneizado e, na sequência, inoculado por via subcutânea em camundongos.

4.3.2. Isolamento de *Toxoplasma gondii* em camundongos

Cada grupo era constituído por dois ou três camundongos albinos Swiss, fêmeas, com 30 a 40 dias de idade, alojados na mesma caixa e identificados individualmente em locais diferentes do corpo com ácido pícrico. Cada camundongo era inoculado, via subcutânea, com 1,0 a 1,2mL da amostra digerida, e eram observados diariamente.

Os camundongos inoculados que apresentavam pelo menos três sinais clínicos compatíveis com a infecção por *T. gondii* (conjuntivite, dispneia, diarreia, ascite, pelos arrepiados/aglutinados, relutância ao se mover, desequilíbrio no andar e torso encurvado) eram submetidos à eutanásia em câmara contendo isoflurano, após terem sido sedados com uma combinação de xilazina/quetamina e seus tecidos (pulmão e cérebro) eram examinados microscopicamente para pesquisa de *T. gondii*.

Os soros dos animais que sobreviviam até quatro semanas pós-inoculação (PI) eram examinados para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii*, por meio do MAT, na diluição de 1:25 (DUBEY, 1997). Para isso, a colheita do sangue era realizada pela punção do venoso submandibular, após a contenção física dos camundongos.

Após o sorodiagnóstico, os animais eram eutanasiados da mesma forma descrita anteriormente, e seus tecidos (pulmão e cérebro) examinados microscopicamente para a presença de *T. gondii* para confirmação do resultado da sorologia. Foram considerados infectados com *T. gondii* os camundongos em que estágios do parasita (taquizoítas e/ou cistos) foram encontrados em seus tecidos.

O tecido (pulmão ou cérebro) de cada camundongo positivo era macerado, separadamente, por meio do uso de um pistilo e um cadinho estéreis e homogeneizado com solução salina estéril. Parte do macerado era separado (aproximadamente 1,5mL) e mantido a -20ºC para realização das técnicas moleculares; o restante era transferido para tubos de 15mL com fundo cônico e centrifugado a 2.500 × *g* por 10 minutos, o sobrenadante era desprezado e o sedimento homogeneizado com meio crioprotetor (SFB 10%, DMS0 5%, em meio RPMI) e estocado em nitrogênio líquido na coleção de isolados de *T. gondii* do setor de Doenças Parasitárias do VPS.

4.4. ANÁLISE MOLECULAR

4.4.1. Extração de DNA

A extração de DNA dos tecidos de camundongos positivos para *T. gondii* foi realizada por meio do PureLink® Genomic DNA Kit (Invitrogen, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

A extração de cada amostra era realizada a partir de 200µL de tecido homogeneizado com solução salina. A essa alíquota, eram adicionados 180µL de *Digestion Buffer* e 20µL de Proteinase K, era feita a homogeneização com vórtex e as amostras incubadas a 56ºC durante quatro horas. Após, adicionavam-se 200µL de *Lysis/Binding Buffer* e 200µL de etanol (96-100%) e a homogeneização era feita com vórtex. A mistura era transferida para uma coluna com um tubo coletor de 2mL e centrifugada a 10.000 × *g* por 1 minuto. Então, descartava-se o tubo coletor, que era substituído por outro igual. À coluna, eram adicionados 500µL de *Wash Buffer 1* e a centrifugação realizada como anteriormente. O tubo coletor era novamente substituído e adicionavam-se 500µL de *Wash Buffer 2* na coluna. Em seguida, era realizada uma centrifugação a 20.000 × *g* por 3 min. Descartava-se o tubo coletor, a coluna era transferida para um microtubo de 1,5mL, e o DNA retido era eluído por meio da adição de 100µL (amostras de cérebro) ou 200µL (amostras de pulmão) de

Elution Buffer. Após um minuto em temperatura ambiente, era feita uma nova centrifugação como a anterior e a coluna descartada. O produto obtido ao final da última centrifugação (DNA extraído) era armazenado a -20ºC.

4.4.2. PCR-RFLP Multilocal para genotipagem de *Toxoplasma gondii*

Foi realizada a PCR-RFLP de todos os isolados de *T. gondii* obtidos. Foram utilizados 11 marcadores [SAG1, SAG2 (5´3´SAG2, alt. SAG2), SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, PK1, L358, CS3 e Apico] capazes de distinguir, sem ambiguidade, as três linhagens clonais (Tipos I, II e III) após a amplificação do DNA-alvo e tratamento com enzimas de restrição (SU; ZHANG; DUBEY, 2006; DUBEY et al., 2007b; PENA et al., 2008). Os primers e enzimas utilizados estão descritos no Quadro 3. Amostras arquétipas (Tipos I, II e III) e de referência (TgCgCa1-Cougar, MAS, TgCatBr5) foram incluídas como controles (Quadro 4).

As sequências de DNA-alvo eram primeiramente amplificadas em multiplex-PCR usando os *primers* externos para todos os marcadores, seguido de *nested*-PCR para os mesmos marcadores, individualmente, utilizando os *primers* internos. Os produtos das PCRs eram primeiramente diluídos 1:2 em água ultrapura.

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação de 25µL: tampão de reação (KCl 50mM; Tris-HCl 10mM, pH 9,0), 200µM de cada nucleotídeo (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0,15µM de cada primer, 2mM de $MgCl_2$, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase Platinum® (Invitrogen, Brasil) e 1,5µL de DNA extraído. Na *nested*-PCR, foi utilizada a mesma mistura, mas com 0,3µM de cada primer.

A PCR era realizada com uma desnaturação inicial a 95ºC por 4 min, seguida de 25 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 s, hibridização a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min e 30 s; seguia-se uma extensão final de 72°C por 2 min. A *nested*-PCR era realizada com uma desnaturação inicial a 95ºC por 4 min, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 s, hibridização a 60°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min; seguia-se uma extensão final de 72°C por 2 min.

Quadro 3 – Informações referentes aos marcadores genéticos e endonucleases utilizados na PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) para genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras provenientes da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Marcador	**Nº. Cromossomo**	**Primers externos#**	**Primers internos#**	**Tamanho (pb)**	**Enzimas de restrição, temperatura, tempo de incubação e concentração do gel de agarose**	**Referência**
SAG1	VIII	F: GTTCTAACCACGCACCCTGAG R: AAGAGTGGGAGGCTCTGTGA	F: CAATGTGCACCTGTAGGAAGC R: GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	*Sau96*I + *Hae*II, 37ºC 1h, gel 2,5%	Grigg et al. (2001)
5´SAG2	VIII	F: GCTACCTCGAACAGGAACAC R: GCATCAACAGTCTCTTCGTTGC	F: GAAATGTTTCAGGTTGCTGC R: GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	*Mbo*I 37ºC 1h, gel 2,5%	Howe et al. (1997); Su et al. (2006)
3´SAG2	VIII	F: TCTGTTCTCCGAAGTGACTCC R: TCAAAGCGTGCATTATCGC	F: ATTCTCATGCCTCCGCTTC R: AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	*Hha*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Howe et al. (1997)
SAG3	XII	F: CAACTCTCACCATTCCACCC R: GCGCGTTGTTAGACAAGACA	F: TCTTGTCGGGTGTTCACTCA R: CACAAGGAGACCGAGAAGGA	311	*Nci*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Grigg et al. (2001); Su et al. (2006)
alt. SAG2	VIII	F: GGAACGCGAACAATGAGTTT R: GCACTGTTGTCCAGGGTTTT	F: ACCCATCTGCGAAGAAAACG R: ATTTCGACCAGCGGGAGCAC	546	*Hinf*I + *Taq*I, 65ºC 30min, gel 2,5%	Lehmann et al. (2000); Su et al. (2006)
BTUB	IX	F: TCCAAATGAGAGAAATCGT R: AAATTGAATGACGAAGAA	F: GAGGTCATCTCGGACGAACA R: TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	*BsiE*I + *Taq*I, 60ºC 1h, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
GRA6	X	F: ATTTGTGTTTCCGAGCAGGT R: GCACCTTCGCTTGTGGTT	F: TTTCCGAGCAGGTGACCT R: TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	*Mse*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Fazaeli et al. (2000); Su et al. (2006)
c22-8	Ib	F: TGATGCATCCATGCGTTTAT R:CCTCCACTTCTTCGGTCTCA	F: TCTCTCTACGTGGACGCC R: AGGTGCTTGGATATTCGC	521	*BsmA*I + *Mbo*II, 37ºC 30min, 55ºC 30min, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
c29-2	III	F: ACCCACTGAGCGAAAAGAAA R: AGGGTCTCTTGCGCATACAT	F: AGTTCTGCAGAGTGTCGC R: TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	*HpyCH4*IV + *Rsa*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
L358	V	F: TCTCTCGACTTCGCCTCTTC R: GCAATTTCCTCGAAGACAGC	F: AGGAGGCGTAGCGCAAGT R: CCCTCTGGCTGCAGTGCT	418	*Hae*III + *Nla*III 37ºC 1h, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
PK1	VI	F: GAAAGCTGTCCACCCTGAAA R: AGAAAGCTCCGTGCAGTGAT	F: CGCAAAGGGAGACAATCAGT R: TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	*Ava*I + *Rsa*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Su et al. (2006)
Apico	Plastídeo	F: TGGTTTTAACCCTAGATTGTGG R: AAACGGAATTAATGAGATTTGAA	F: TGCAAATTCTTGAATTCTCAGTT R: GGGATTCGAACCCTTGATA	640	*Afl*II + *Dde*I 37ºC 1h, gel 3%	Su et al. (2006)
CS3	VIIa	F: GTGTATCTCCGAGGGGGTCT R: TGTGACTTCTTCGCATCGAC	F: AGCGGATTTCCAACACTGTC R: CTGCTGCATTCACAAACTCC	557	*N1a*III + *Mbo*I, 37ºC 1h, gel 2,5%	Khan et al. (2005); Pena et al. (2008)

F: Forward (senso); R: Reward (antissenso)

Fonte: Alves (2021).

Quadro 4 – Genotipagem multilocal das amostras arquétipas Tipos I, II e III e das amostras de referência de *Toxoplasma gondii* utilizadas como controles positivos na PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP).

Identidade	**Marcadores PCR-RFLP**												**Genótipos**
	SAG 1	**5'3'SAG2[1]**	**alt. SAG2[2]**	**SAG3**	**BTUB**	**GRA6**	**c22-8**	**c29-2**	**L358**	**PK1**	**Apico**	**CS3**	
RH	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	Tipo I
PTG	II ou III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	Tipo II
CTG	II ou III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Tipo III
TgCgCa1 (Cougar)	I	II	II	III	II	II	II	u-1	I	u-2	I	II	Referência (não-arquétipo #66)
MAS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	Referência (não-arquétipo #17)
TgCatBr5	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II	Referência (não-arquétipo #19)

u-1 e u-2 são alelos diferentes dos alelos clonais I, II e III.
[1] Marcador SAG2 baseado na terminação 5´ e 3´ da sequência do gene (HOWE et al., 1997).
[2] Novo marcador SAG2 baseado na terminação 5´ da sequência do gene (SU; ZHANG; DUBEY, 2006).

Fonte: Alves (2021).

A fim de investigar o padrão de RFLP de cada amostra (SU et al., 2010), o produto de *nested*-PCR era submetido à digestão com enzimas de restrição. Eram utilizados 3µL de cada produto de *nested*-PCR, misturados a 17µL de reação de digestão contendo Tampão CutSmart® (New England Biolabs, EUA) (1×) e 0,5 a 4,0 unidades de cada enzima de restrição. As amostras eram incubadas na temperatura indicada pelo fabricante como ideal para cada enzima (Quadro 3). Após a incubação, as amostras eram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose a 2,0 – 3,0%, contendo SYBR® Safe (Thermofisher, EUA), e usando tampão de corrida TBE 1× - pH 8,0 (44,58M Tris-base; 0,44M ácido bórico; 12,49mM EDTA) a 100V/50mA. Posteriormente, o gel era visualizado e capturado sob luz ultravioleta (UV) utilizando-se um analisador de imagem (AlphaImager®, EUA).

4.4.3. Análise de Microssatélites de *Toxoplasma gondii*

Foi realizada a genotipagem de *T. gondii* utilizando 15 marcadores MS em um único ensaio de PCR-Multiplex (AJZENBERG et al., 2010). Oito marcadores foram utilizados para tipagem das amostras (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 e X1.1) e sete marcadores (N60, N82, AA, N61, N83, M48 e M102) utilizados como “digitais” (*fingerprintings*), para subtipagem. Os *primers* utilizados estão descritos no Quadro 5. A genotipagem de MS para os arquétipos I, II e III encontra-se no Quadro 6.

Foi utilizada a seguinte mistura de reagentes na PCR, para uma reação de 25µL: 12,5µL de 2× Qiagen multiplex PCR Master MIX (Qiagen®, EUA), 5 pmol de cada *primer* e 5µL de DNA extraído.

A PCR era realizada com uma desnaturação inicial a 95ºC por 15 min, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 s, hibridização a 61°C por 3min e extensão a 72°C por 30 s; por último, extensão final a 60ºC por 30 min.

Os produtos de PCR eram diluídos em formamida deionizada na proporção de 1:20 para as amostras de DNA de pulmão e 1:10 para as amostras de DNA de cérebro, então 1µL do produto diluído de cada amostra era misturado a um mix de reação preparado com 0,5µL de ROX 500® (Applied Biosystems, EUA) e 23,5µL de formamida deionizada por amostra. Essa mistura era submetida à desnaturação a 95ºC por 5 min e a eletroforese era realizada no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer Ab Hitachi (Life Tech). Como controle positivo foi utilizada a cepa de referência ME-49 (Tipo II).

Quadro 5 – Informações referentes aos marcadores genéticos utilizados na PCR para genotipagem por meio da análise de Microssatélites*, de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras provenientes da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Marcador	**Nº Cromossomo**	***Primers***	**Tamanho (pb)**
TUB2	IX	F: GTCCGGGTGTTCCTACAAAA R: TTGGCCAAAGACGAAGTTGT	287-291
W35	II	F: GGTTCACTGGATCTTCTCCAA R: AATGAACGTCGCTTGTTTCC	242-248
TgM-A	X	F: GGCGTCGACATGAGTTTCTC R: TGGGCATGTAAATGTAGAGATG	203–211
B18	VIIa	F: TGGTCTTCACCCTTTCATCC R: AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA	156-170
B17	XII	F: AGGGATAAGTTTCTTCACAACGA R: GGCAACAGGAGGTAGAGGAG	334-366
M33	IV	F: TACGCTTCGCATTGTACCAG R: TCTTTTCTCCCCTTCGCTCT	165-173
IV.1	IV	F: GAAGTTCGGCCTGTTCCTC R: TCTGCCTGGAAAAGGAAAGA	272-282
XI.1	XI	F: GCGTGTGACGAGTTCTGAAA R: AAGTCCCCTGAAAAGCCAAT	354-362
M48	Ia	F: AACATGTCGCGTAAGATTCG R: CTCTTCACTGAGCGCCTTTC	209-243
M102	VIIa	F: CAGTCCAGGCATACCTCACC R: CAATCCCAAAATCCCAAACC	164-196
N60	Ib	F: GAATCGTCGAGGTGCTATCC R: AACGGTTGACCTGTGGCGAGT	132-157
N82	XII	F: TGCGTGCTTGTCAGAGTTC R: GCGTCCTTGACATGCACAT	105-145
AA	VIII	F: GATGTCCGGTCAATTTTGCT R: GACGGGAAGGACAGAAACAC	251-332
N61	VIIb	F: ATCGGCGGTGGTTGTAGAT R: CCTGATGTTGATGTAAGGATGC	79-123
N83	X	F: ATGGGTGAACAGCGTAGACA R: GCAGGACGAAGAGGATGAGA	306-338

*Ajzenberg et al. (2010)

Fonte: Alves (2021).

Quadro 6 – Genotipagem* por meio da análise de Microssatélites** de amostras arquétipas de *Toxoplasma gondii*.

Referência	Tipo MS	Tipo PCR-RFLP	Origem	Hospedeiro	Marcadores Microssatélites**														
					TUB2	***W35***	***TgM-A***	***B18***	***B17***	***M33***	***IV.1***	***XI.1***	*M48*	*M102*	*N60*	*N82*	*AA*	*N61*	*N83*
ENT	I	#10 (I)	França	Humano	291	248	209	160	342	169	274	358	209	166	145	119	267	087	306
ME49	II	#1 (II)	EUA	Ovino	289	242	207	158	336	169	274	356	215	174	142	111	265	091	310
NED	III	#2 (III)	França	Humano	289	242	205	160	336	165	278	356	209	190	147	111	267	091	312

*Ajzenberg et al. (2010)
**Os marcadores de tipagem estão indicados em negrito.

Fonte: Alves (2021).

4.5. ANÁLISE DE DADOS

4.5.1. Genotipagem

Os dados obtidos por meio da genotipagem PCR-RFLP dos isolados de *T. gondii* obtidos neste estudo foram comparados com os dados disponíveis na plataforma ToxoDB (http://toxodb.org/toxo/) e na bibliografia recente. A relação filogenética dos isolados de *T. gondii* do presente estudo entre si e com isolados previamente descritos foi analisada utilizando o programa SplitsTree4 (HUSON, 1998; HUSON; BRYANT, 2006).

Os resultados de genotipagem por MS foram analisados por meio do software GeneMapper® 4.1 (Applied Biosystems, EUA). A relação genealógica de *T. gondii* foi baseada em 15 marcadores MS usando o software Populations 1.2.32 (LANGELLA, 1999) e a rede gerada com o software MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

4.5.2. Diversidade genética de *Toxoplasma gondii*

A diversidade entre diferentes populações de *T. gondii* na Região Sul e no Brasil foi avaliada por meio do Índice de Simpson (SIMPSON, 1949). Este índice, utilizado para quantificar a diversidade, considera o número de espécies (no estudo apresentado, os genótipos) presentes, assim como a frequência. Os valores variam entre 0 e 1, quanto maior o valor, maior a diversidade. O índice representa a probabilidade de dois indivíduos, selecionados aleatoriamente de um conjunto de amostras, pertencerem a espécies/tipos diferentes e é calculado da seguinte forma:

$$D = 1 - \left(\frac{1}{N(N-1)}\right) = \sum_{n=1}^{s} nj\ (nj-1)$$

Na fórmula, N é o número total de isolados, S é o número total de genótipos e nj, o número de isolados pertencentes a j-ésimo genótipo.

A diversidade foi avaliada analisando os resultados de genotipagem PCR-RFLP da Região Sul e do Brasil, primeiramente, sem incluir os dados do presente estudo e, após, com a inclusão dos isolados obtidos. A diversidade das populações

de *T. gondii* utilizando os dados de genotipagem por MS obtidos nos isolados dos três estados da Região Sul do presente estudo também foi avaliada.

4.5.3. Estatística

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada por meio do software R 4.1.0 (R CORE TEAM, 2021) e JASP 0.14.1 (JASP TEAM, 2020).

Foi realizada a análise exploratória para avaliar os resultados obtidos por meio do MAT para anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas. A comparação da proporção de animais soropositivos e soronegativos entre os estados foi realizada pelo teste chi-quadrado, e a comparação dos títulos de anticorpos entre os estados foi realizada por meio do teste de Kruskal-Wallis.

Para a avaliação da associação do título de anticorpos das galinhas e o sucesso de isolamento, tanto geral quanto por estado, foi realizado o teste de Mann-Whitney. Para avaliar as proporções de isolamento entre os estados foi utilizado o teste chi-quadrado.

A associação do alelo encontrado no marcador CS3 na PCR-RFLP foi realizada: por meio do teste de Kruskal-Wallis, em relação aos estados e em relação ao indivíduo para avaliação da associação com a sobrevida do camundongo; por meio do teste de Kruskal-Wallis, com teste *post-hoc* Dunn, em relação ao quadro clínico agudo ou crônico, sendo que quando eram encontrados taquizoítas no pulmão do camundongo era considerado agudo e quando eram observados apenas cistos no cérebro o quadro era classificado como crônico. A sobrevida do camundongo foi calculada de acordo com o tempo que o animal sobreviveu até apresentar pelo menos três sinais de infecção por *T. gondii* e ser eutanasiado.

A associação do quadro clínico (agudo ou crônico) com a sobrevida de cada camundongo foi feita por meio do teste de Wilcoxon.

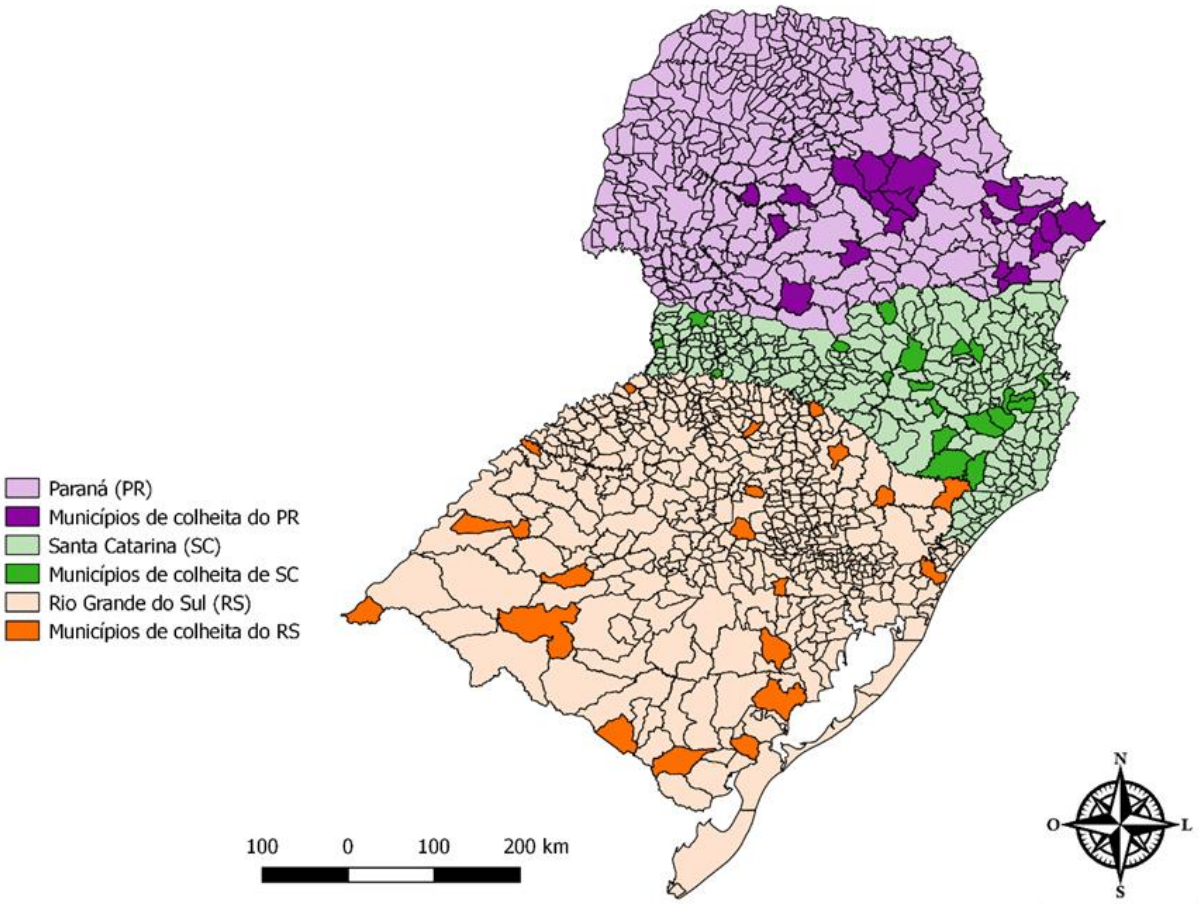
4.6. CONDUTA ÉTICA

Todos os animais foram manuseados de acordo com os protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Brasil (CEUA n. 6378010719).

5 RESULTADOS

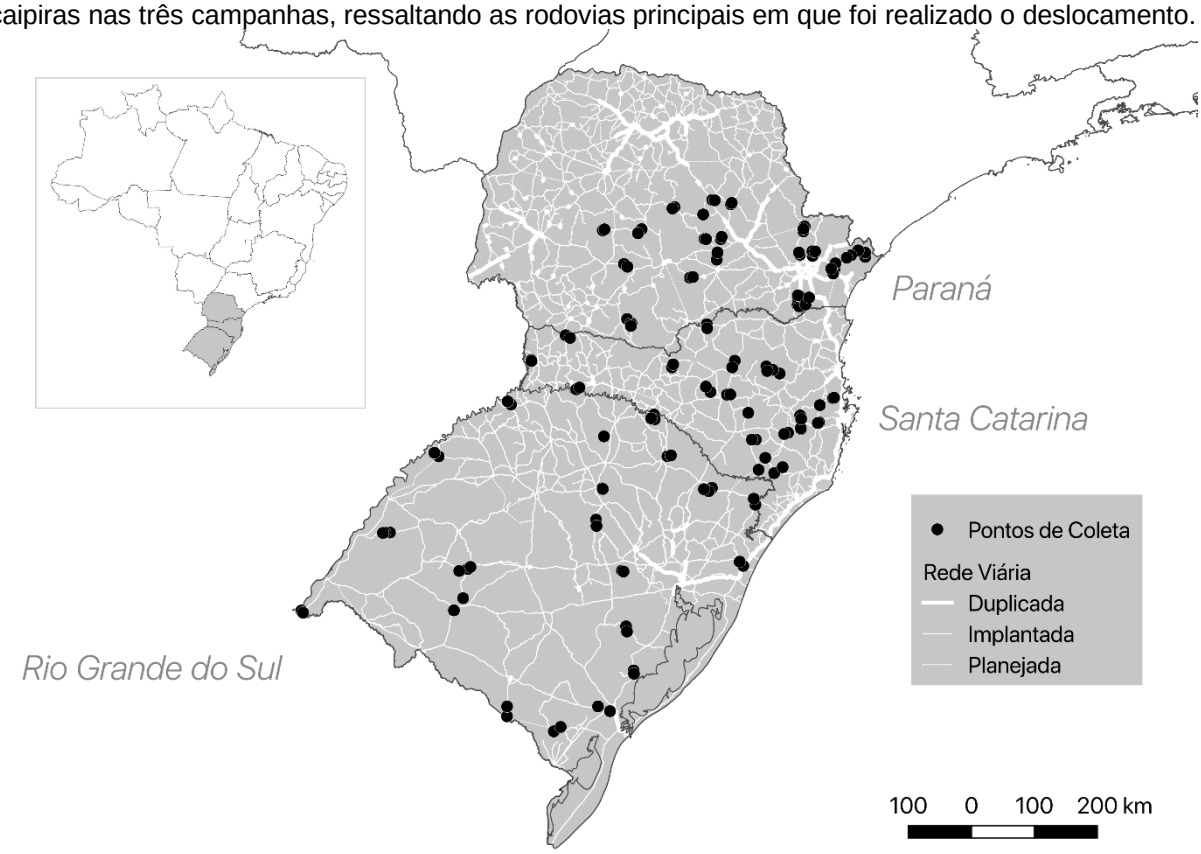
Foi realizada uma campanha para cada estado da Região Sul do Brasil (Paraná-PR, Santa Catarina-SC e Rio Grande do Sul-RS), a fim de colher as amostras de galinhas caipiras. No total das três campanhas, foram percorridos 19.752km em rodovias, compreendendo 44 dias, e houve captação de 607 galinhas de 61 municípios (Figura 2), totalizando 140 propriedades (Figura 3).

Figura 2 – Mapa da Região Sul do Brasil realçando os municípios em que foram captadas as galinhas caipiras nas três campanhas.



Fonte: Alves (2021).

Figura 3 – Mapa da Região Sul do Brasil demarcando os pontos em que foram captadas as galinhas caipiras nas três campanhas, ressaltando as rodovias principais em que foi realizado o deslocamento.



Fonte: Alves (2021).

5.1. SORODIAGNÓSTICO

Das 607 galinhas examinadas, 333 (54,9%) foram positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* (título ≥ 10). No estado do Paraná, foram captadas 214 galinhas e 110 (51,4%) foram positivas (Tabela 1); em Santa Catarina, foram coletadas 192 galinhas e 100 (52,1%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* (Tabela 2) e, no Rio Grande do Sul, foi realizada a colheita de 201 galinhas e 123 (61,2%) foram positivas (Tabela 3). A distribuição dos animais positivos, segundo o município, encontra-se nas tabelas abaixo (Tabelas 1, 2 e 3). Para um nível de significância de 5%, não foi observada diferença estatística entre as proporções de sorologias positivas nos três estados (p=0,087).

Tabela 1 – Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado do Paraná e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município.

			Soropositivas	
Município	**IDH**	**Nº de galinhas**	**Nº**	**%**
Agudos do Sul	0,66	9	6	66,7
Antonina	0,687	10	3	30
Bocaiúva do Sul	0,64	11	1	9,1
Cândido Abreu	0,629	8	8	100
Cantagalo	0,635	10	1	10
Cerro Azul	0,573	10	8	80
Coronel Domingos Osório	0,6	10	4	40
Guaraqueçaba	0,587	22	9	40,9
Imbaú	0,622	10	1	10
Imbituva	0,66	10	8	80
Inácio Martins	0,6	14	9	64,3
Ipiranga	0,652	10	8	80
Itaperuçu	0,637	8	6	75
Ivaí	0,651	9	8	88,9
Laranjal	0,585	12	5	41,7
Mandirituba	0,655	12	6	50
Morretes	0,686	10	0	0
Reserva	0,618	5	3	60
Santa Maria do Oeste	0,609	7	5	71,4
Tibagi	0,664	7	5	71,4
Tijucas do Sul	0,636	10	6	60
TOTAL		**214**	**110**	**51,4**

Fonte: Alves (2021).

Tabela 2 – Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado de Santa Catarina e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município.

			Soropositivas	
Município	**IDH**	**Nº de galinhas**	**Nº**	**%**
Alfredo Wagner	0,668	10	8	80,0
Angelina	0,687	7	1	14,3
Bandeirante	0,672	10	9	90,0
Bom Jardim da Serra	0,696	10	1	10,0
Bom Retiro	0,699	10	8	80,0
Campo Erê	0,69	10	4	40,0
Canelinha	0,697	13	2	15,4
Caxambu do Sul	0,691	10	5	50,0
Frei Rogério	0,682	10	6	60,0
Irineópolis	0,699	10	5	50,0
José Boiteux	0,694	10	8	80,0
Leoberto Leal	0,686	12	5	41,7
Macieira	0,662	12	4	33,3
Major Gercino	0,698	5	2	40,0
Painel	0,664	10	7	70,0
Palmeira	0,671	5	4	80,0
Santa Cecília	0,698	10	3	30,0
São Cristóvão do Sul	0,665	8	5	62,5
São Joaquim	0,687	11	7	63,6
Vitor Meireles	0,673	9	6	66,7
TOTAL		**192**	**100**	**52,1**

Fonte: Alves (2021).

Tabela 3 – Presença de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em galinhas caipiras captadas no estado do Rio Grande do Sul e respectivo Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do município.

			Soropositivas	
Município	**IDH**	**Nº de galinhas**	**Nº**	**%**
Aceguá	0,687	10	4	40
Barra do Quaraí	0,662	10	1	10
Barros Cassal	0,65	10	5	50
Capão Bonito do Sul	0,637	10	6	60
Capão do Leão	0,637	9	4	44
Dom Feliciano	0,587	10	8	80
Esperança do Sul	0,661	10	6	60
Herval	0,687	10	5	50
Ibirapuitã	0,638	10	10	100
Maçambará	0,684	12	6	50
Machadinho	0,692	10	5	50
Maquiné	0,682	7	2	29
Monte Alegre do Sul	0,65	13	9	69
Pirapó	0,669	10	6	60
Quatro Irmãos	0,689	5	5	100
Rosário do Sul	0,699	10	6	60
São José dos Ausentes	0,663	10	5	50
São Lourenço do Sul	0,687	10	10	100
São Vicente do Sul	0,685	15	12	80
Vale Verde	0,646	10	8	80
TOTAL		**201**	**123**	**61,2**

Fonte: Alves (2021).

Os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* das galinhas captadas nos três estados variaram de 10 a 40.960 e estão apresentados no Tabela 4. Não foi observada diferença entre os títulos das amostras provenientes dos três estados (p=0,497).

Tabela 4 – Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* obtidos por meio do Teste de Aglutinação Modificado (MAT) das galinhas caipiras captadas na Região Sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Resultado da sorologia	**Nº de galinhas**	**%**
10	29	8,7
20	22	6,6
40	28	8,4
80	40	12
160	60	18
320	37	11,1
640	44	13,2
1280	35	10,5
2560	23	6,9
5120	11	3,3
10240	3	0,9
40960	1	0,3
TOTAL	**333**	

Fonte: Alves (2021).

5.2. ISOLAMENTO DE *Toxoplasma gondii*

Dentre as 333 galinhas consideradas soropositivas para *T. gondii* (título ≥ 10), foram realizados 304 bioensaios em camundongos (galinhas com título ≥ 20) e se obtiveram 160 isolados de *T. gondii* (Tabela 5). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos títulos entre os grupos com e sem isolamento ($p<0,001$). As medianas dos títulos observadas nas galinhas dos três estados para os grupos sem e com isolamento foram 160 e 320, respectivamente (Figura 4).

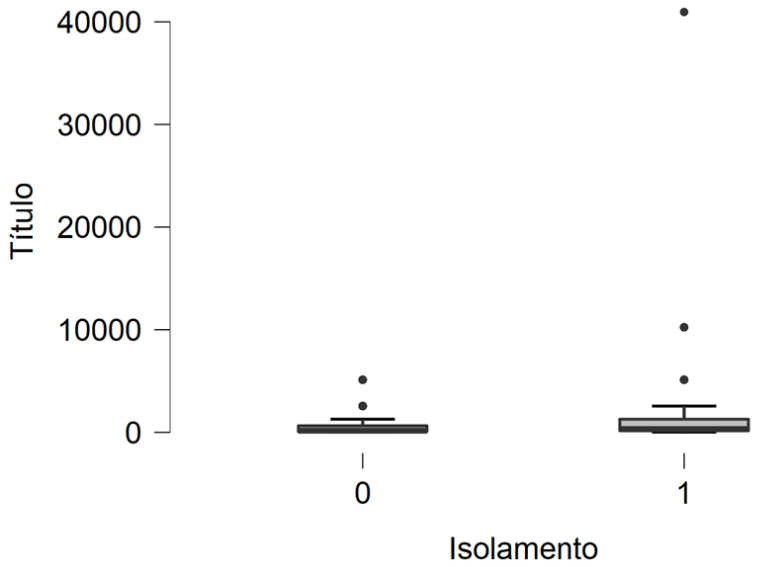
Do total, 69 isolados foram de galinhas do Paraná, 39 de Santa Catarina e 52 do Rio Grande do Sul.

Tabela 5 – Títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Teste de Aglutinação Modificado – MAT) em galinhas caipiras da Região Sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), segundo o número de galinhas, número de bioensaios em camundongos e o número de isolados de *T. gondii* obtidos.

Resultado sorologia	**Nº de galinhas**	**Nº de bioensaios**	**Nº de isolados de *T. gondii***
10	29	0	-
20	22	22	6
40	28	28	10
80	40	40	16
160	60	60	29
320	37	37	24
640	44	44	29
1280	35	35	21
2560	23	23	15
5120	11	11	6
10240	3	3	3
40960	1	1	1
TOTAL	**333**	**304**	**160**

Fonte: Alves (2021).

Figura 4 – Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) nos três estados da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

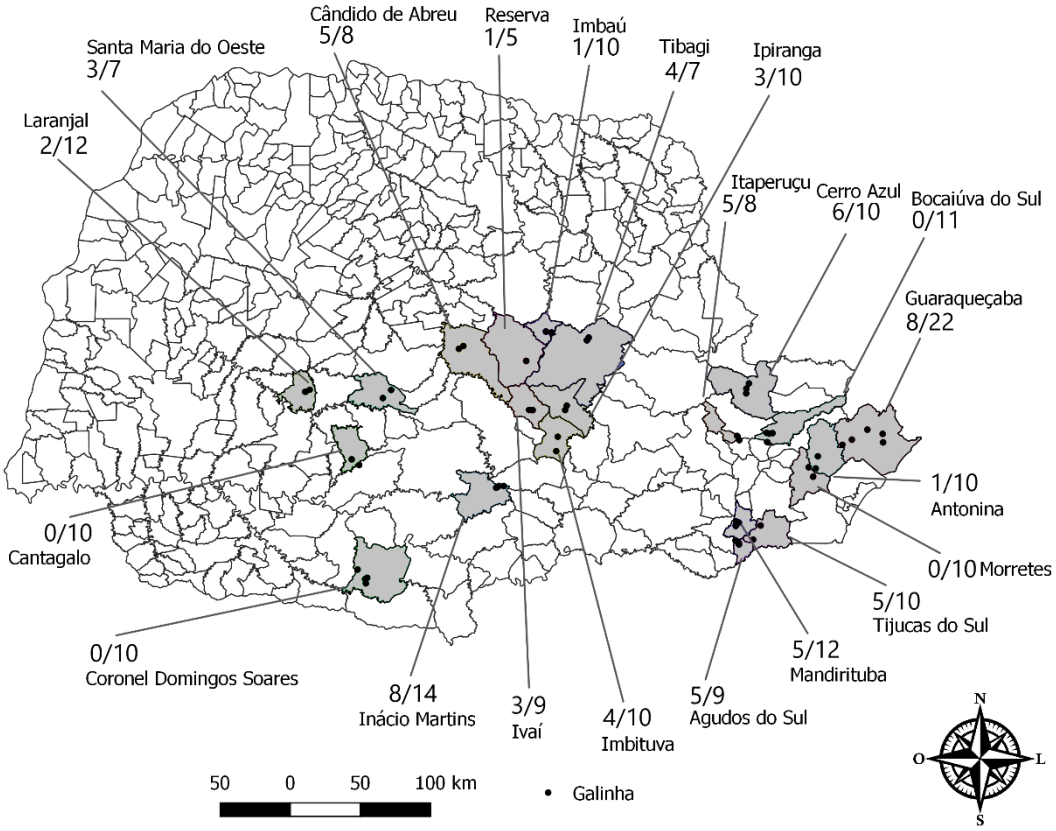


Fonte: Alves (2021).

No estado do Paraná, foram colhidas galinhas caipiras em 21 municípios, sendo eles: Agudos do Sul, Antonina, Bocaiúva do Sul, Cândido Abreu, Cantagalo, Cerro Azul, Coronel Domingos Soares, Guaraqueçaba, Imbaú, Imbituva, Inácio Martins, Ipiranga, Itaperuçu, Ivaí, Laranjal, Mandirituba, Morretes, Reserva, Santa Maria do Oeste, Tibagi e Tijucas do Sul (Figura 5). Foram feitos 102 bioensaios em

camundongos, obtendo-se 69 isolados de *T. gondii* (Tabela 6). Ao avaliar o título de anticorpos anti-*T. gondii* e o sucesso de isolamento no estado do Paraná foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos títulos entre os grupos sem e com sucesso de isolamento (p=0,006), com medianas dos títulos 80 e 640, respectivamente (Figura 6).

Figura 5 – Pontos de colheita das galinhas caipiras no estado do Paraná e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente.



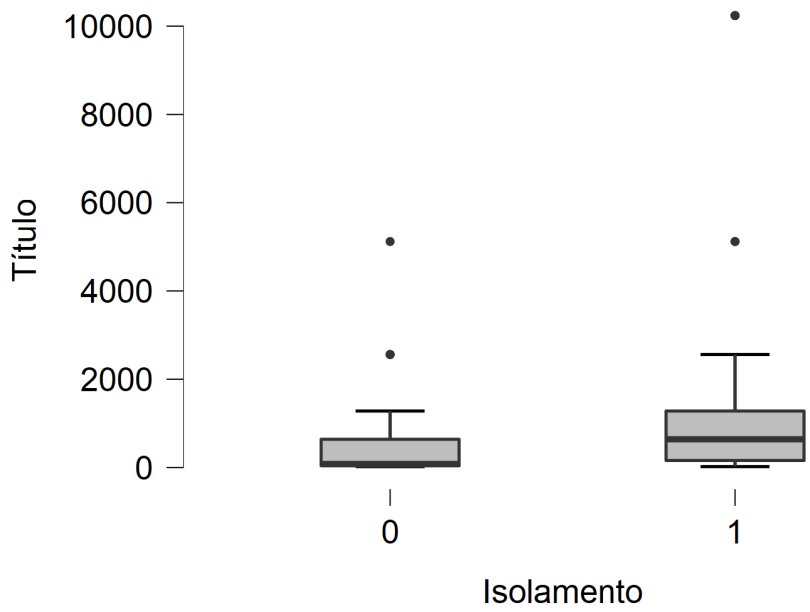
Fonte: Alves (2021).

Tabela 6 – Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio de bioensaio em camundongos das galinhas caipiras captadas no estado do Paraná, segundo o município de colheita.

Município	**Nº de bioensaios**	**Nº de isolados**	**Sucesso de isolamento (%)**
Agudos do Sul	5	5	100
Antonina	3	1	33,3
Bocaiúva do Sul	1	0	0
Cândido Abreu	8	5	62,5
Cantagalo	1	0	0
Cerro Azul	8	6	75
Coronel Domingos Soares	4	0	0
Guaraqueçaba	8	8	100
Imbaú	1	1	100
Imbituva	8	4	50
Inácio Martins	9	8	88,9
Ipiranga	8	3	37,5
Itaperuçu	6	5	83,3
Ivaí	8	3	37,5
Laranjal	4	2	50
Mandirituba	6	5	83,3
Morretes	0	0	0
Reserva	1	1	100
Santa Maria do Oeste	3	3	100
Tibagi	4	4	100
Tijucas do Sul	6	5	83,3
TOTAL	**102**	**69**	**67,7**

Fonte: Alves (2021).

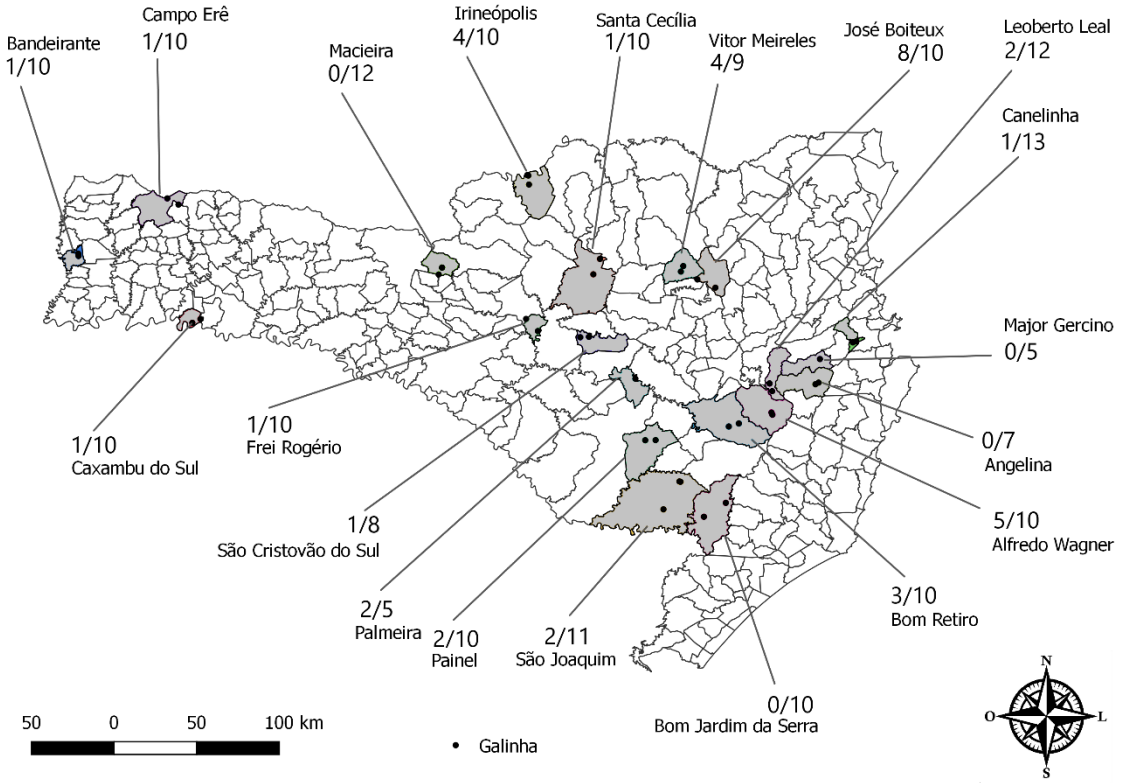
Figura 6 – Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado do Paraná.



Fonte: Alves (2021).

No estado de Santa Catarina, foram colhidas galinhas caipiras em 20 municípios, sendo eles: Alfredo Wagner, Angelina, Bandeirante, Bom Jardim da Serra, Bom Retiro, Campo Erê, Canelinha, Caxambu do Sul, Frei Rogério, Irineópolis, José Boiteux, Leoberto Leal, Macieira, Major Gercino, Painel, Palmeira, Santa Cecília, São Cristóvão do Sul, São Joaquim e Vitor Meireles (Figura 7). Foram feitos 97 bioensaios em camundongos, obtendo-se 39 isolados de *T. gondii* (Tabela 7). Ao avaliar o título de anticorpos anti-*T. gondii* e o sucesso de isolamento no estado de Santa Catarina não foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos títulos entre os grupos sem e com sucesso de isolamento (p=0,085), com medianas dos títulos 160 e 320, respectivamente (Figura 8).

Figura 7 – Pontos de colheita das galinhas no estado de Santa Catarina e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente.



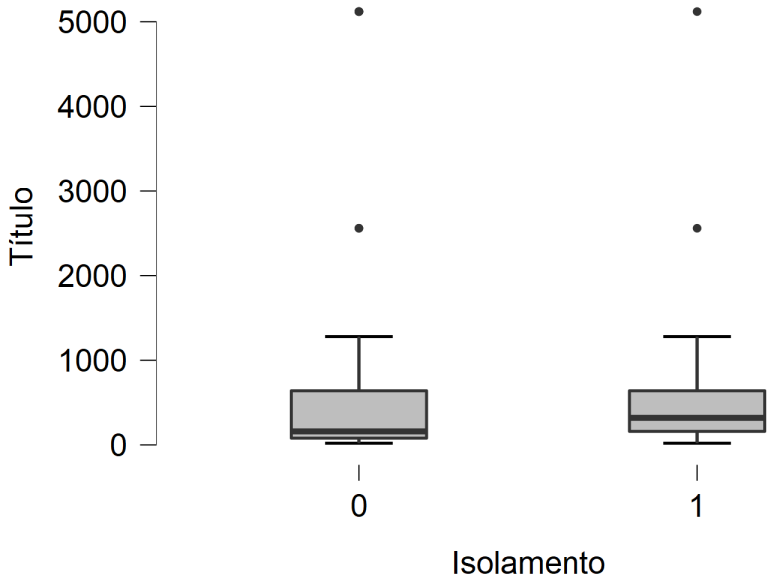
Fonte: Alves (2021).

Tabela 7 – Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio de bioensaio em camundongos das galinhas captadas no estado de Santa Catarina, segundo o município de colheita.

Município	**Nº de bioensaios**	**Nº de isolados**	**Sucesso de isolamento (%)**
Alfredo Wagner	7	5	71,4
Angelina	1	0	0
Bandeirante	9	1	11,1
Bom Jardim da Serra	1	0	0
Bom Retiro	8	3	37,5
Campo Erê	4	1	25
Canelinha	2	1	50
Caxambu do Sul	5	1	20
Frei Rogério	5	1	20
Irineópolis	5	4	80
José Boiteux	8	8	100
Leoberto Leal	5	2	40
Macieira	4	0	0
Major Gercino	2	0	0
Painel	7	2	28,6
Palmeira	4	2	50
Santa Cecília	3	1	33,3
São Cristóvão do Sul	5	1	20
São Joaquim	7	2	28,6
Vitor Meireles	5	4	80
TOTAL	**97**	**39**	**40,2**

Fonte: Alves (2021).

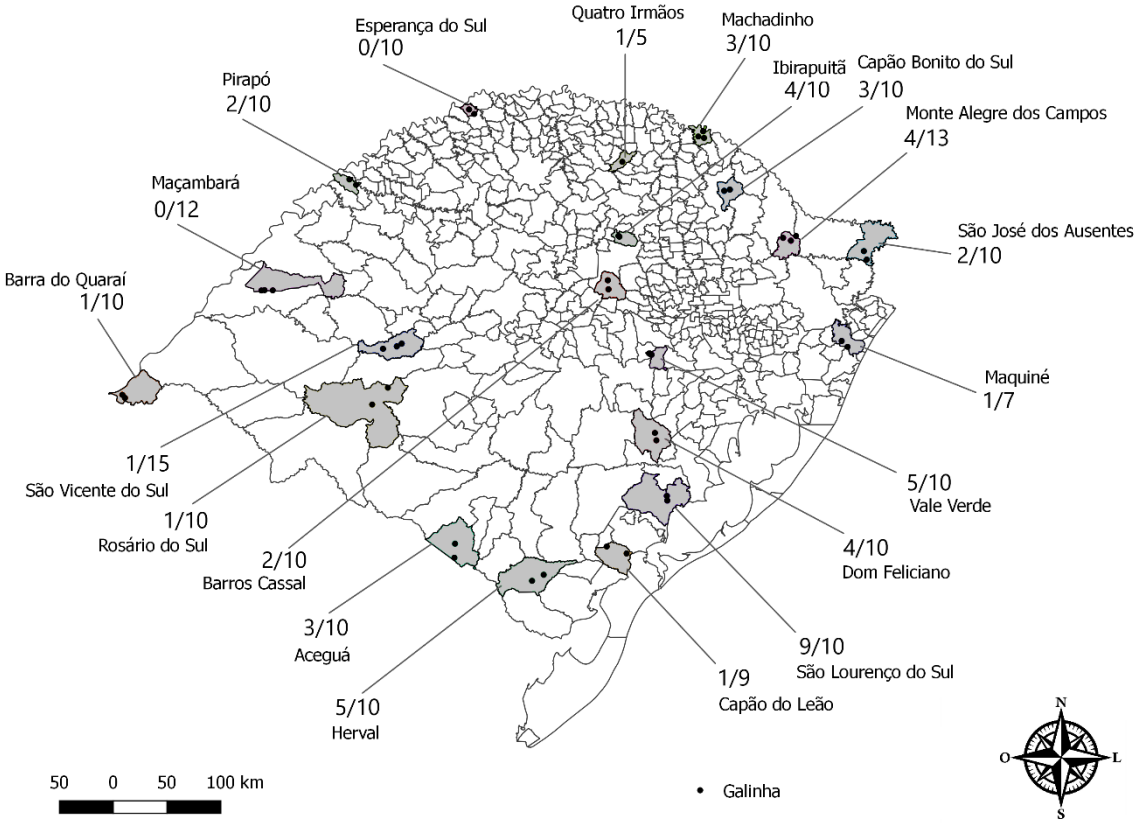
Figura 8 – Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado de Santa Catarina.



Fonte: Alves (2021).

No estado do Rio Grande do Sul, foram colhidas galinhas caipiras em 20 municípios, sendo eles: Aceguá, Barra do Quaraí, Barros Cassal, Capão Bonito do Sul, Capão do Leão, Dom Feliciano, Esperança do Sul, Herval, Ibirapuitã, Maçambará, Machadinho, Maquiné, Monte Alegre dos Campos, Pirapó, Quatro Irmãos, Rosário do Sul, São José dos Ausentes, São Lourenço do Sul, São Vicente do Sul e Vale Verde (Figura 9). Foram feitos 105 bioensaios em camundongos, obtendo-se 52 isolados de *T. gondii* (Tabela 8). Ao avaliar o título de anticorpos anti-*T. gondii* e o sucesso de isolamento no estado do Rio Grande do Sul, foi observada uma diferença estatisticamente significativa nos títulos entre os grupos sem e com sucesso de isolamento (p=0,012), com medianas dos títulos 160 e 320, respectivamente (Figura 10).

Figura 9 – Pontos de colheita das galinhas no estado do Rio Grande do Sul e número de isolados de *Toxoplasma gondii*/número de galinhas colhidas nos municípios, respectivamente.



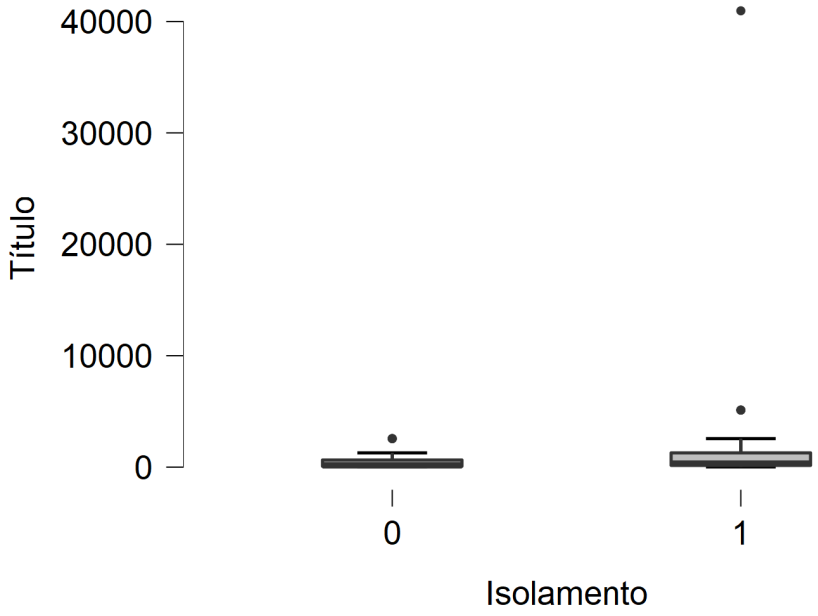
Fonte: Alves (2021).

Tabela 8 – Número de bioensaios realizados, número de isolados de *Toxoplasma gondii* e sucesso de isolamento por meio do bioensaio em camundongos das galinhas caipiras captadas no estado do Rio Grande do Sul, segundo o município de colheita.

Municípios	**Nº de bioensaios**	**Nº de isolados**	**Sucesso de isolamento (%)**
Aceguá	3	3	100
Barra do Quaraí	1	1	100
Barros Cassal	4	2	50
Capão Bonito do Sul	6	3	50
Capão do Leão	2	1	50
Dom Feliciano	6	4	50
Esperança do Sul	3	0	0
Herval	5	5	100
Ibirapuitã	10	4	40
Maçambará	5	0	0
Machadinho	5	3	60
Maquiné	2	1	50
Monte Alegre dos Campos	6	4	66,7
Pirapó	6	2	33,3
Quatro Irmãos	5	1	20
Rosário do Sul	3	1	25
São José dos Ausentes	5	2	50
São Lourenço do Sul	9	9	100
São Vicente do Sul	12	1	8,3
Vale Verde	7	5	62,5
TOTAL	**105**	**52**	49,5

Fonte: Alves (2021).

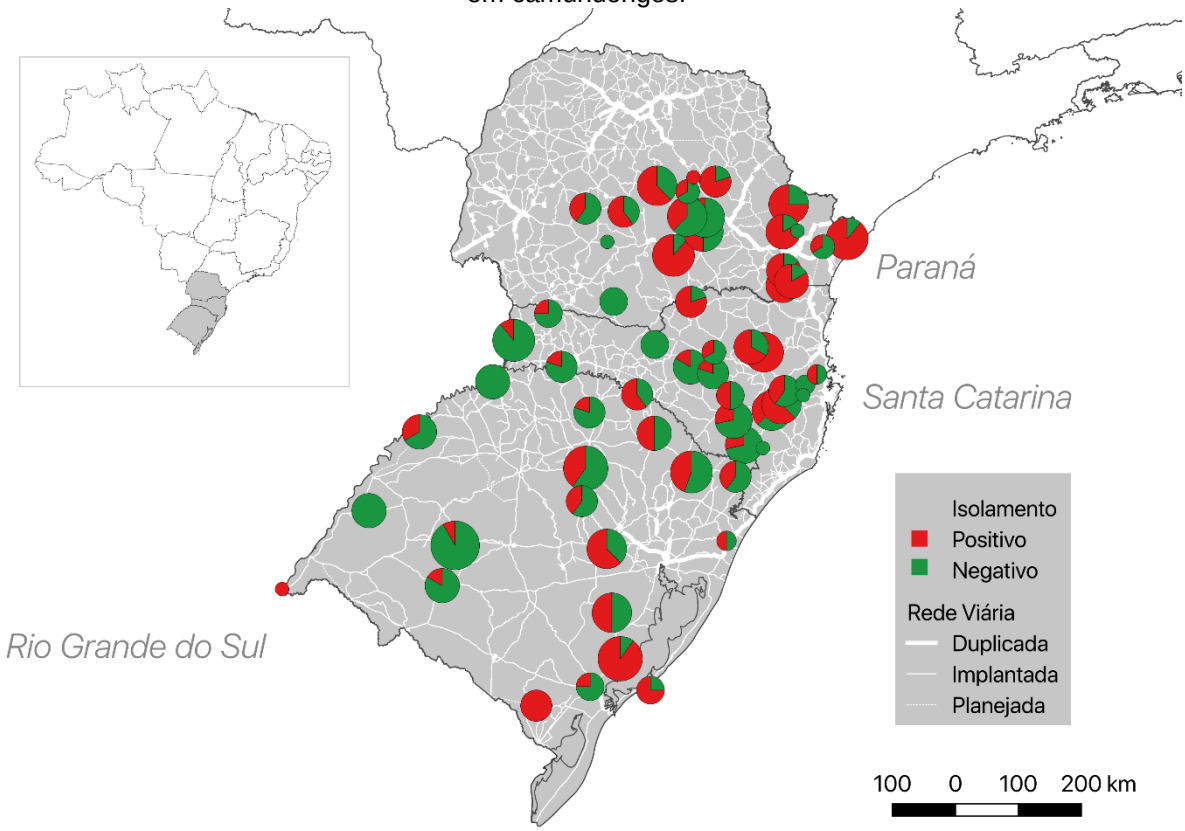
Figura 10 – Diagrama de caixa demonstrando a distribuição e valores discrepantes dos títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras nos bioensaios sem (0) e com isolamento (1) no estado do Rio Grande do Sul.



Fonte: Alves (2021).

A Figura 11 representa graficamente o sucesso de isolamento em cada município dos três estados da Região Sul do Brasil onde as galinhas foram colhidas.

Figura 11 – Mapa da Região Sul do Brasil com gráficos representando, por município de colheita das galinhas caipiras, o sucesso no isolamento de *Toxoplasma gondii*. O tamanho de cada gráfico corresponde ao número de galinhas caipiras soropositivas nas quais foram realizados os bioensaios em camundongos.



Fonte: Alves (2021).

A Tabela 9 resume os resultados obtidos em cada um dos estados, agrupando os resultados de sorologia, bioensaio e isolamento. Utilizando o teste chi-quadrado, observou-se que houve diferença estatística nas proporções de isolamento entre os estados ($p<0,001$). A proporção de isolamento no Paraná (67,6%) foi superior às proporções observadas nos estados do Rio Grande do Sul (49,5%) e Santa Catarina (40,2%).

Tabela 9 – Número total de galinhas, número de galinhas soropositivas, número de bioensaios e de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos nos estados da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Estado	Nº de galinhas	Nº de galinhas soropositivas*	Nº de bioensaios	Nº de isolados	% de isolamento
Paraná	214	110	102	69	67,7
Santa Catarina	192	100	97	39	40,2
Rio Grande do Sul	201	123	105	52	49,5
TOTAL	**607**	**333**	**304**	**160**	**52,6**

* título ≥ 10 no Teste de Aglutinação Modificado (MAT).

Fonte: Alves (2021).

5.3. CARACTERIZAÇÃO GENÓTIPICA DE *Toxoplasma gondii* POR PCR-RFLP

A genotipagem PCR-RFLP completa foi obtida de 158 isolados de *T. gondii* revelando 41 genótipos (Tabela 10), sendo que sete deles apresentaram isolados com variação no alelo do marcador CS3. Foram identificados 20 genótipos no Paraná, 17 em Santa Catarina, e 22 no Rio Grande do Sul.

O genótipo clonal Tipo I foi isolado de cinco galinhas: duas da cidade de Palmeira/SC e uma de José Boiteux/SC, de Salto Veloso/SC e de Machadinho/RS; o clonal Tipo II variante foi isolado de uma galinha de Herval/RS; o Tipo III foi isolado de 10 galinhas: três galinhas de Aceguá/RS, duas de Irineópolis/SC, duas de Vale Verde/RS, duas de Dom Feliciano/RS e uma de Ibirapuitã/RS.

Das linhagens com ampla distribuição no Brasil, consideradas clonais brasileiras, foi encontrado o Tipo BrI em oito galinhas do estado do Paraná, nas cidades de Santa Maria do Oeste (1), Inácio Martins (1), Imbituva (1), Cerro Azul (4) e Guaraqueçaba (1); o Tipo BrII foi encontrado em duas galinhas das cidades de Tijucas do Sul/PR e São Lourenço do Sul/RS, e o Tipo BrIII em 11 galinhas nas cidades de José Boiteux/SC (2), Vitor Meireles/SC (3), Leoberto Leal/SC (1), Monte Alegre do Sul/RS (2), Ibirapuitã/RS (1), Vale Verde/RS (1) e Capão do Leão/RS (1).

Dos demais genótipos encontrados, 18 já foram descritos anteriormente em diferentes estados brasileiros e 17 foram genótipos inéditos. A Figura 12 representa graficamente os genótipos obtidos em cada município.

Tabela 10 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, por meio da PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP).

Identificação do isolado	**Município/Estado**	**Marcadores RFLP**												**Genótipo PCR-RFLP***
		SAG1	**5´3´SAG2**	**alt. SAG2**	**SAG3**	**BTUB**	**GRA6**	**c22-8**	**c29-2**	**L358**	**PK1**	**Apico**	**CS3**	
CK300,301	Palmeira/SC	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	Tipo I
CK381	José Boiteux/SC													
CK535	Machadinho/RS													
CK494	Herval/RS	II/III	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II	Tipo II var.
CK275,278	Irineópolis/SC	II/III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	III	Type III
CK480,482, 483	Aceguá/RS													
CK556	Ibirapuitã/RS													
CK570,576	Vale Verde/RS													
CK581,584	Dom Feliciano/RS													
CK16	Sta. Maria do Oeste/PR	I	I	I	III	I	II	u-1	I	I	I	I	I	Tipo BrI #6
CK40	Inácio Martins/PR													

CK56	Imbituva/PR													
CK109-112	Cerro Azul/PR													
CK133	Guaraqueçaba/PR													
CK197	Tijucas do Sul/PR	I	I	II	III	III	III	I	III	I	II	III	I	Tipo BrII
CK596	São Lourenço do Sul/RS													#11
CK521,522	Monte Alegre do Sul/RS	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	III	Tipo BrIII
CK550	Ibirapuitã/RS													#08
CK573	Vale Verde/RS													
CK602	Capão do Leão/RS													
CK370	Leoberto Leal/SC	I	III	III	III	III	III	II	III	III	III	III	II	Tipo BrIII
														#08
														CS3 var.
CK379,380	José Boiteux/SC													
CK404-406	Vitor Meireles/SC													
CK27	Laranjal/PR	I	III	III	III	III	III	III	I	III	III	III	II	#14
CK38	Inácio Martins/PR													

CK135	Guaraqueçaba/PR												
CK517	Monte Alegre dos Campos/RS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	#17
CK340	Bom Retiro/SC												
CK519	Monte Alegre do Sul/RS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	III	#17 CS3 var.
CK2	Reserva/PR	I	III	III	III	III	III	I	I	I	u-1	I	II	#19
CK6,8,10, 11, 13	Cândido Abreu/PR													
CK14,17	Sta. Maria do Oeste/PR													
CK23	Laranjal/PR													
CK51	Inácio Martins/PR													
CK83,85	Ipiranga/PR													
CK136	Guaraqueçaba/PR													
CK196	Tijucas do Sul/PR													
CK204	Mandirituba/PR													
CK219	Frei Rogério/SC													
CK260	Campo Erê/SC													
CK321,325	São Joaquim/SC													

CK403	Vitor Meireles/SC													
CK424	Pirapó/RS													
CK469	Rosário do Sul/RS													
CK575,579	Vale Verde/RS													
CK591-593	São Lourenço do Sul/RS													
CK96	Imbaú/PR	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	III	II	#21
CK531,534	Capão Bonito do Sul/RS													
CK388	Alfredo Wagner/SC	II/III	III	III	III	III	III	I	III	III	I	III	III	#26
CK185,187, 188	Agudos do Sul/PR	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	II	#53
CK198	Agudos do Sul/PR	u-1	I	II	III	III	III	II	I	I	III	I	u-3	#53 CS3 var.
CK295	São Cristóvão/SC													
CK566	Barros Cassal/RS	I	I	I	III	III	III	I	I	III	I	III	III	#87
CK252	Bandeirante/SC	I	III	III	III	I	III	II	III	III	III	III	III	#116

CK418	Pirapó/RS													
CK545	Quatro Irmãos/RS													
CK597,599	São Lourenço do Sul/RS													
CK558	Ibirapuitã/RS	u-1	I	II	III	III	III	II	I	III	III	I	III	#135
CK58,62	Imbituva/PR	I	III	III	III	III	III	II	I	I	III	I	II	#162
CK65-67	Ivaí/PR													
CK87	Tibagi/PR													
CK105	Cerro Azul/PR													
CK115,118	Itaperuçu/PR													
CK148,150, 151,154	Guaraqueçaba/PR													
CK172,199	Tijucas do Sul/PR													
CK189,195, 202,205	Mandirituba/PR													
CK274	Irineópolis/SC													
CK186	Agudos do Sul/PR	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	III	#163
CK393	Alfredo Wagner/SC													
CK458	São Vicente do	I	III	III	III	III	III	II	I	III	III	III	I	#163

	Sul/RS												CS3 var.
CK557	Ibirapuitã/RS												
CK385,387, 390	Alfredo Wagner/SC	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	III	I	I	#173
CK48	Inácio Martins/PR	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	III	I	II	#173
														CS3 var.
CK351	Canelinha/SC													
CK106	Cerro Azul/PR	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	u-1	I	II	#175
CK102	Tibagi/PR	u-1	I	II	III	III	III	II	III	I	III	I	II	#206
CK184	Agudos do Sul/PR													
CK242	Caxambu do Sul/SC	u-1	I	II	III	III	III	III	I	I	III	III	II	#236
CK49,50,52	Inácio Martins/PR	u-1	I	II	III	III	II	II	I	I	III	I	I	#246
CK486	Herval/RS	I	I	I	III	I	I	II	III	III	I	III	III	#271
CK84	Ipiranga/PR	I	I	I	III	III	III	III	III	I	I	I	I	#278
CK314,315	Painel/SC													

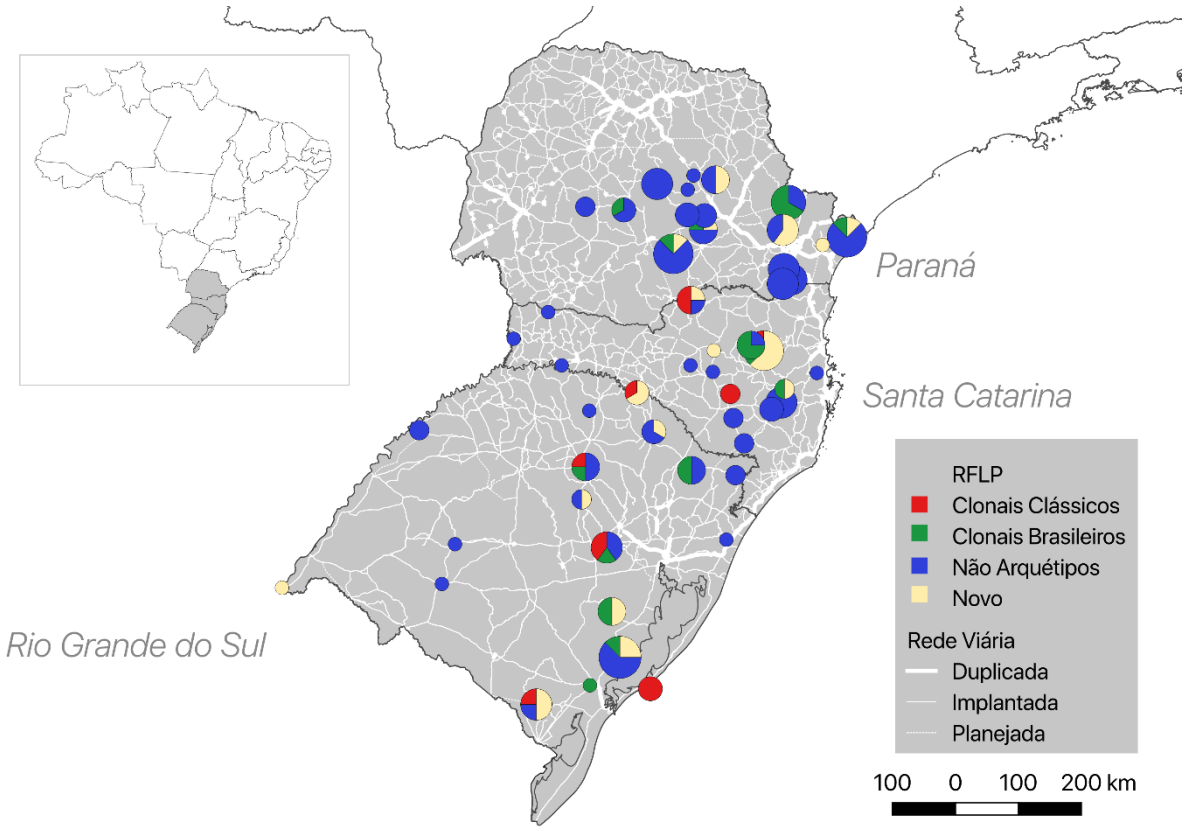
CK337,338	Bom Retiro/SC													
CK499	Maquiné/RS													
CK372	Leoberto Leal/SC	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	u-2	I	I	NOVO1
CK44	Inácio Martins/PR	I	III	III	III	III	III	I	I	III	u-1	I	II	NOVO2
CK55	Imbituva/PR	I	I	u-1	I	III	II	u-1	I	I	II	I	u-2	NOVO3
CK100	Tibagi/PR	I	III	III	III	III	III	I	I	I	III	I	II	NOVO4
CK280	Irineópolis/SC													
CK103	Tibagi/PR	I	I	u-1	III	III	II	II	I	I	I	I	u-3	NOVO5
CK119-121	Itaperuçu/PR	I	I	I	III	III	III	III	III	III	III	III	II	NOVO6
CK137	Guaraqueçaba/PR	u-1	I	II	u-1	III	II	u-1	I	I	III	I	I	NOVO7
CK166	Antonina/PR	I	III	III	III	I	II	I	III	III	u-1	I	u-1	NOVO8
CK288	Santa Cecília/SC	I	III	III	III	III	III	II	I	I	u-1	I	II	NOVO9
CK394-398	José Boiteux/SC	u-1	I	II	I	III	II	u-1	I	I	II	I	II	NOVO10

CK490,491	Herval/RS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	u-2	I	u-2	NOVO11
CK533	Capão Bonito do Sul/RS	u-1	I	II	III	III	III	u-1	I	I	u-2	I	I	NOVO11 CS3 var.
CK508,510	São José dos Ausentes/RS	I	III	III	III	III	III	III	I	III	I	III	II	NOVO12
CK542,544	Machadinho/RS	u-1	I	II	III	III	II	u-1	I	I	II	I	I	NOVO13
CK560	Barros Cassal/RS	u-1	I	II	III	III	III	II	I	III	III	III	I	NOVO14
CK582	Dom Feliciano/RS	I	I	I	III	III	I	I	I	I	I	III	I	NOVO15
CK588	Dom Feliciano/RS	I	I	I	III	III	I	I	I	I	I	III	III	NOVO15 CS3 var.
CK443	Barra do Quaraí/RS	u-1	III	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	II	NOVO16
CK595,598	São Lourenço do Sul/RS	I	I	II	III	III	I	III	III	I	II	III	I	NOVO17

*TOXO-DB (http://toxodb.org/toxo/) e http://web.utk.edu/~csu1/Toxoplasma.html

Fonte: Alves (2021).

Figura 12 – Mapa da Região Sul do Brasil com gráficos representando, por município de colheita das galinhas caipiras, o resultado da genotipagem por PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) dos isolados de *Toxoplasma gondii*, segundo a classificação do genótipo. O tamanho de cada gráfico corresponde ao número de isolados.



Fonte: Alves (2021).

A rede filogenética construída com os 41 genótipos obtidos dos 158 isolados por meio da PCR-RFLP está apresentada na Figura 13. Nesta rede filogenética, pode-se visualizar como os genótipos de *T. gondii* identificados nos isolados do presente estudo se estruturam em relação aos genótipos clonais clássicos I, II e III e aos genótipos mais prevalentes no Brasil (clonais brasileiros BrI, BrII e BrIII, e #13). Primeiramente, a reticulação formada revela a elevada diversidade dos isolados obtidos na Região Sul. Alguns *clusters*, indicando proximidade entre os isolados, são observados, porém nenhum deles é exclusivo de amostras de apenas um dos estados. Observa-se um *cluster* com amostras próximas aos Tipos III e BrIII, e *clusters* que não envolvem os tipos clonais clássicos e brasileiros. Por outro lado, há uma grande divergência em relação aos Tipos I e BrI e, particularmente, aos Tipos II e BrII. Os novos genótipos caracterizados se distribuem aleatoriamente por toda a rede filogenética.

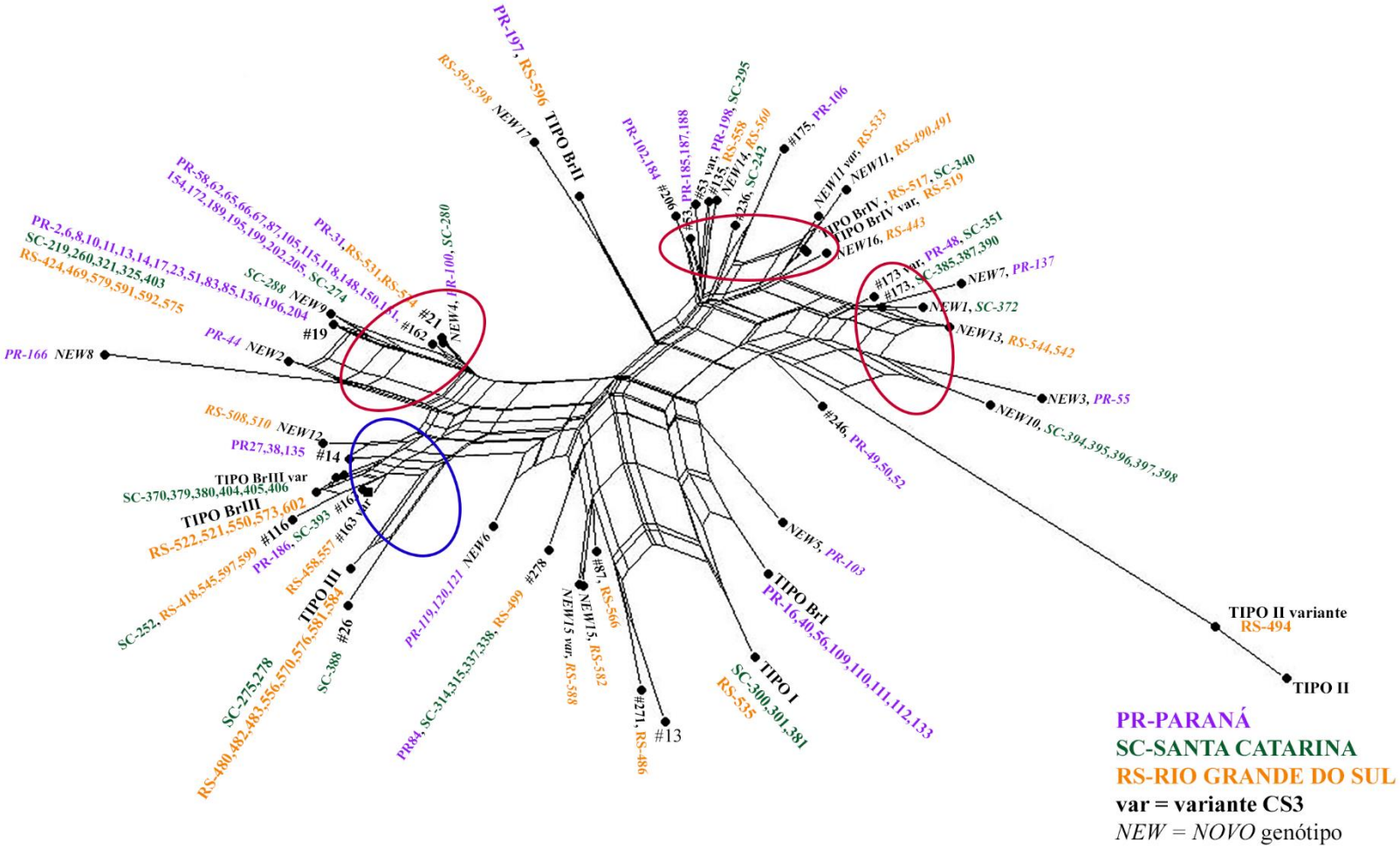
Na Figura 14 está representada a análise por rede filogenética dos 200 genótipos de *T. gondii* descritos no Brasil, correspondentes a 922 amostras, incluindo as do presente estudo. Destacam-se a divergência do Tipo II e do Tipo II variante das demais amostras e a estruturação em três *clusters* principais (círculos em vermelho e verde), com divergência particular das amostras do *cluster* do círculo em verde em relação aos outros. Nos três *clusters* principais, há distribuição de genótipos que circulam em todas as regiões do Brasil. Alguns subgrupos também são observados, destacando-se três deles (círculos em azul); no subgrupo que compreende o Tipo III e o Tipo BrIII, as amostras próximas circulam em todas as regiões; no subgrupo que compreende o Tipo BrII, as amostras próximas são do Sul, Sudeste e do Centro-Oeste, e no subgrupo que compreende o Tipo BrIV, as amostras próximas são do Sudeste e Sul, com apenas um genótipo próximo que circula no Norte. Em relação aos novos genótipos descritos no presente estudo, eles se distribuem nos três *clusters* principais, particularmente no *cluster* que compreende o Tipo BrIV.

O valor de D para as populações de *T. gondii* genotipadas por PCR-RFLP no Brasil, sem a inclusão dos genótipos obtidos no presente estudo foi de 0,969 (764 indivíduos; 183 genótipos) e na Região Sul foi de 0,942 (124 indivíduos; 48 genótipos). Com a inclusão dos isolados obtidos o valor de D passa a 0,970 e 0,951, respectivamente.

O alelo encontrado para o marcador CS3 da PCR-RFLP dos isolados obtidos não apresentou diferença estatística entre os estados da Região Sul ($p = 0,0528$). A associação do alelo CS3 com a sobrevida do camundongo, sem considerar os camundongos que foram eutanasiados com mais de 30 dias PI, também não apresentou diferença estatística entre os alelos ($p = 0,179$).

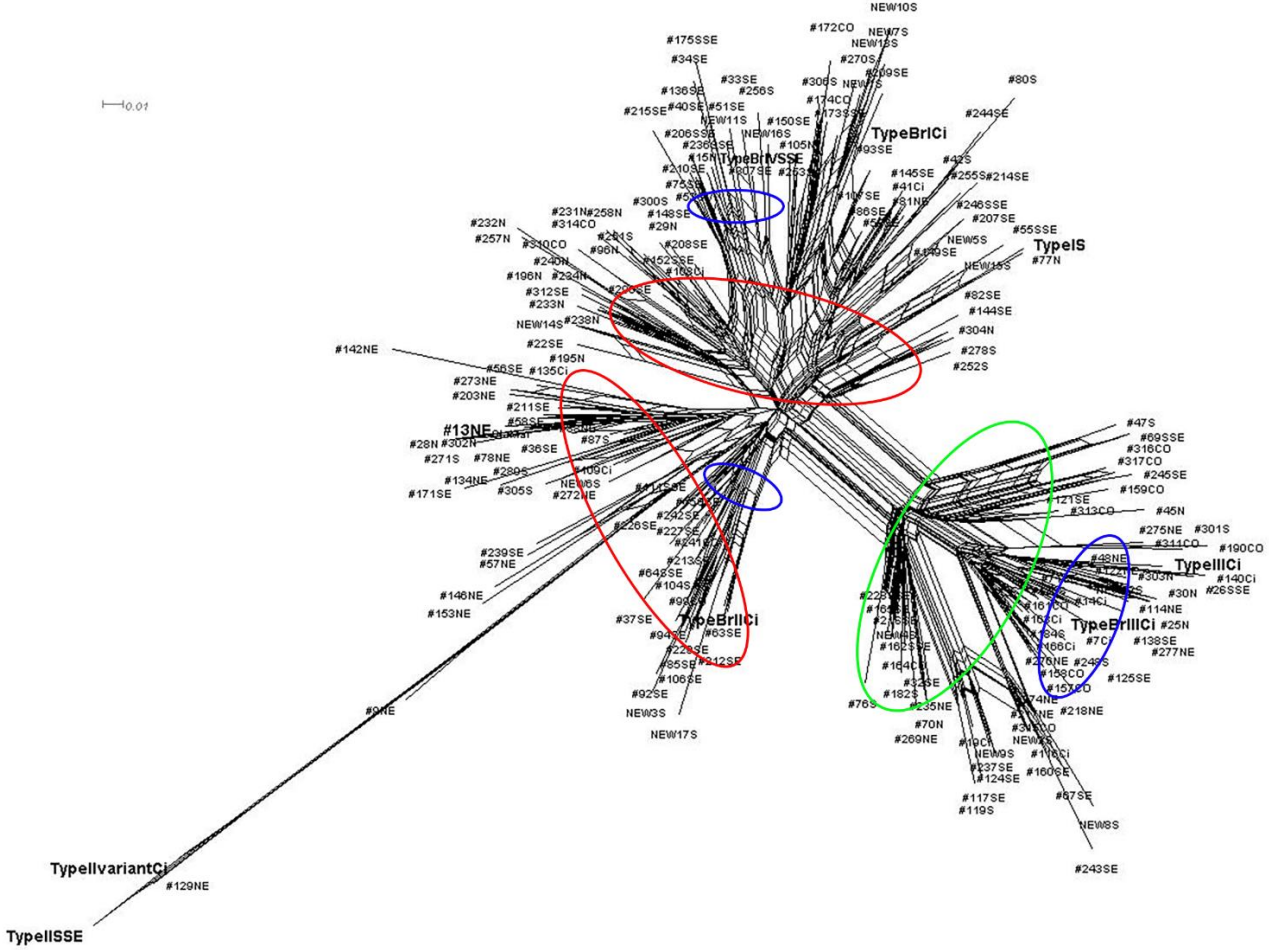
Foi observada diferença ($p = 0,00133$) entre o quadro clínico (agudo ou crônico) e o tempo de sobrevida do camundongo, sendo o tempo médio de eutanásia do quadro agudo (19,3 dias), menor que o crônico (26,2 dias).

Figura 13 – Rede filogenética de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de galinhas caipiras dos estados da Região Sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) utilizando dados de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP). Como referência, são representados os tipos clonais clássicos I, II e III, os tipos clonais brasileiros BrI, BrII e BrIII e o genótipo #13. O círculo azul destaca um cluster de amostras próximas aos Tipos III e BrIII. Os círculos vermelhos destacam clusters de amostras não-arquétipas divergentes dos tipos clássicos.



Fonte: Alves (2021).

Figura 14 – Análise por rede filogenética de *Toxoplasma gondii* no Brasil, usando dados de PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP). As amostras de referência Tipo I, Tipo II, Tipo II variante, Tipo III, Tipo BrI, Tipo BrII, Tipo BrIII, Tipo BrIV e #13 estão em negrito. Os números representam a identificação do genótipo PCR-RFLP. A circulação respectiva das amostras nas regiões do Brasil está indicada por: N=Norte; NE=Nordeste; CO=Centro-Oeste; NNE= Norte/Nordeste; SSE=Sul/Sudeste; Ci=circula em outras duas regiões ou mais de duas. Os círculos em vermelho e verde indicam os principais *clusters* formados e os círculos em azul destacam *clusters* secundários.



Fonte: Alves (2021).

O Quadro 1, apresentado na introdução, foi atualizado com os resultados do presente estudo (Tabela 11). A Tabela 12 apresenta os genótipos compartilhados entre as regiões do Brasil, com a inclusão dos resultados obtidos, tendo o compartilhamento de 36 diferentes genótipos, ou seja, que foram isolados de duas ou mais regiões. Os genótipos #6 (Tipo BrI) e #8 (Tipo BrIII) são os únicos que foram isolados nas cinco regiões do país. Os genótipos #2 e #11 foram identificados em todas as regiões, exceto no Norte. Os demais genótipos, foram isolados de animais de duas ou três regiões.

Tabela 11 – Total de amostras genotipadas, número de genótipos e hospedeiros de isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos por meio da PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP) identificados em amostras brasileiras da Região Sul após os resultados do presente estudo.

Estado	**Nº de amostras genotipadas**	**Nº de genótipos**	**Hospedeiro**
Paraná	92	28	Galinha
	27	12	Gato
	4	2	Humano
	9	5	Pomba
	6	3	Roedor
Santa Catarina	50	20	Galinha
	2	1	Bovino
	1	1	Gato
Rio Grande do Sul	77	28	Galinha
	1	1	Coelho
	1	1	Equino
	2	2	Silvestre
	2	1	Humano
	1	1	Perdiz
	7	5	Ovino
	3	1	Suíno
TOTAL	**286**	**113**	

Fonte: Alves (2021).

Tabela 12 – Genótipos compartilhados entre as regiões geográficas do Brasil, obtidos por meio da PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA (PCR-RFLP).

	Centro-oeste	**Nordeste**	**Norte**	**Sudeste**
Centro-oeste				
Nordeste	#2, #6, #7, #8, #11, #109, #116, #166			
Norte	#6, #8, #41, #116	#6, #7, #8, #116		
Sudeste	#2, #6, #8, #11, #14, #19, #41, #108, #109	#2, #6, #8, #11, #13, #36, #109, #135, #163	#6, #8, #41	
Sul	#2, #6, #8, #11, #14, #19, #116, #140, #166	#2, #3, #6, #8, #11, #116, #135, #163	#6, #8, #116	#1, #2, #6, #8, #11, #14, #17, #19, #21, #26, #53, #55, #64, #65, #69, #111, #135, #152, #162, #163, #173, #175, #206, #228, #236, #246

#1: Tipo II; #2: Tipo III; #3: Tipo II variante; #6: Tipo BrI; #8: Tipo BrIII; #11: Tipo BrII.

Fonte: Alves (2021).

5.4. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE *Toxoplasma gondii* POR MS

A genotipagem por MS completa, ou seja, dos 15 marcadores, foi possível em 158 isolados de *T. gondii*. Examinando os oito marcadores de tipagem, foram identificados 60 tipos, porém, observando o conjunto dos 15 marcadores, um total de 118 genótipos foi revelado e 40 representaram possíveis clones circulantes, ou seja, amostras idênticas (Tabela 13). No estado do Paraná, foram identificados 24 tipos e 53 genótipos (16 clones); em Santa Catarina, foram observados 18 tipos, sendo 26 genótipos (13 clones); no Rio Grande do Sul, 30 tipos e 39 genótipos (11 clones).

Foi identificada tipagem correspondente ao Tipo I variante (APICO=I) de três isolados de galinhas de Santa Catarina e um do Rio Grande do Sul; ao Tipo II em uma galinha do Rio Grande do Sul, e ao Tipo III de duas aves de Santa Catarina e nove do Rio Grande do Sul.

Além dos tipos clonais clássicos, foram identificados os tipos não-arquétipos África 1 de uma galinha do Paraná; Caribe 1 de uma ave de Santa Catarina; América do Sul 1 de uma ave do Paraná e uma do Rio Grande do Sul; América do Sul 2 de cinco galinhas do Paraná; América do Sul 3 de uma ave do Paraná; América do Sul 4 de 30 galinhas do Paraná, cinco de Santa Catarina e duas do Rio Grande do Sul. Os demais isolados foram identificados como não-arquétipos, considerando os oito marcadores de tipagem.

Na Figura 15 está representada a relação genealógica dos 158 isolados de *T. gondii* de galinhas da Região Sul obtidos no presente estudo, usando resultados da análise de MS. Ressalta-se a formação de um *cluster* (círculo azul) com amostras pertencentes ao tipo não-arquétipo América do Sul 4 (South American 4), composto particularmente com isolados do Paraná. Os outros isolados dos três estados distribuem-se em inúmeros pequenos *clusters.*

O valor de D para as populações de *T. gondii* genotipadas por MS nos isolados do presente estudo nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foi 0,959; 0,927 e 0,954, respectivamente.

Tabela 13 – Genotipagem de isolados de *Toxoplasma gondii* de galinhas caipiras dos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul por meio da análise de Microssatélites e indicação do genótipo PCR-RFLP correspondente para comparação da identidade dos genótipos.

				Microssatélites															
				Marcadores de Tipagem								Marcadores de subtipagem							
ID	**Município/Estado**	**Genótipo PCR-RFLP***	**Tipo MS**	**TUB2**	**W35**	**TgM-A**	**B18**	**B17**	**M33**	**MIV.1**	**MXI.1**	**M48**	**M102**	**N60**	**N82**	**AA**	**N61**	**N83**	**Nº de subtipos**
CK300	Palmeira/SC	Tipo I	Tipo I var	291	248	209	160	334	167	274	358	221	166	145	125	269	87	306	1
CK301	Palmeira/SC	Tipo I	Tipo I var	291	248	209	160	334	167	274	358	221	166	145	125	269	87	306	1(clone)
CK381	José Boiteux/SC	Tipo I	Tipo I var	291	248	209	160	334	167	274	358	223	166	145	127	269	87	306	2
CK535	Machadinho/RS	Tipo I	Tipo I var	291	248	209	160	334	167	274	358	225	166	145	129	277	87	306	3
CK494	Herval/RS	Tipo II var. 3	Tipo II	289	242	207	158	336	169	274	356	213	174	140	111	259	89	314	4
CK275	Irineópolis/SC	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	265	87	312	5
CK278	Irineópolis/SC	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	265	87	312	5(clone)
CK480	Aceguá/RS	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	267	89	312	6
CK482	Aceguá/RS	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	267	89	312	6(clone)
CK483	Aceguá/RS	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	267	89	312	6(clone)
CK556	Ibirapuitã/RS	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	109	263	89	312	7
CK570	Vale Verde/RS	Tipo III	Não-arquétipo	289	242	204	160	336	165	278	356	213	190	147	111	263	87	312	11
CK576	Vale Verde/RS	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	111	263	89	312	8
CK581	Dom Feliciano	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	265	89	312	9
CK584	Dom Feliciano	Tipo III	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	109	265	89	312	9(clone)
CK16	Sta. Maria do Oeste/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	233	166	142	111	269	93	306	12
CK40	Inácio Martins/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	233	166	142	111	267	89	306	13

CK56	Imbituva/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	227	166	142	111	269	89	306	14
CK109	Cerro Azul/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	239	166	142	111	269	89	306	15
CK110	Cerro Azul/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	239	166	142	111	269	89	306	15(clone)
CK111	Cerro Azul/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	239	166	142	111	269	89	306	15(clone)
CK112	Cerro Azul/PR	#6 BrI	Não-arquétipo	291	242	205	160	338	169	272	354	239	166	142	111	269	89	306	15(clone)
CK133	Guaraqueçaba/PR	#6 BrI	Africa I	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	149	113	271	89	308	16
CK370	Leoberto Leal/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	129	312	17
CK379	José Boiteux/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	129	312	17(clone)
CK380	José Boiteux/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	129	312	17(clone)
CK404	Victor Meireles/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	125	312	18
CK405	Victor Meireles/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	117	312	19
CK406	Victor Meireles/SC	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	162	348	165	278	358	223	164	142	111	263	117	312	19(clone)
CK522	RS-Monte Alegre do Sul/RS	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	261	111	312	20
CK521	Monte Alegre do Sul/RS	#08 BrIII	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	263	107	312	21
CK550	Ibirapuitã/RS	#08 BrIII	Não-arquétipo	291	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	261	85	314	22
CK573	Vale Verde/RS	#08 BrIII	Não-arquétipo	291	242	205	160	348	165	278	356	213	190	142	111	259	89	316	23
CK602	Capão do Leão/RS	#08 BrIII	Não-arquétipo	291	242	205	160	348	165	278	356	213	188	142	111	261	87	314	24
CK197	Tijucas do Sul/PR	#11 BrII	South American	289	242	205	160	342	165	278	358	237	164	147	111	316	91	308	25

			1																
CK596	São Lourenço do Sul/RS	#11 BrII	South American 1	289	242	205	160	342	165	278	358	233	164	145	111	316	89	308	26
CK27	Laranjal/PR	#14	South American 1	289	242	205	162	344	165	278	358	223	164	142	111	263	103	312	27
CK38	Inácio Martins/PR	#14	South American 1	289	242	205	162	344	165	278	358	225	164	142	111	263	117	312	28
CK135	Guaraqueçaba/PR	#14	Não-arquétipo	289	242	205	163	342	165	278	358	219	164	142	111	267	111	312	30
CK517	Monte Alegre do Sul/RS	#17	Não-arquétipo	289	246	205	164	342	165	276	358	217	174	147	109	305	85	322	31
CK340	Bom Retiro/SC	#17	Não-arquétipo	291	240	205	160	362	165	276	356	233	174	140	111	297	97	341	32
CK519	Monte Alegre do Sul/RS	#17	Não-arquétipo	289	242	203	160	348	165	278	358	213	192	136	111	291	87	312	33
CK469	Rosário do Sul/RS	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	354	165	278	356	231	174	140	111	265	91	314	34
CK260	Campo Erê/SC	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	358	165	278	356	229	174	140	111	269	91	314	35
CK14	Sta. Maria do Oeste/PR	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	360	165	278	356	227	174	140	111	267	91	314	36
CK424	Pirapó/RS	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	360	165	278	356	223	174	140	111	267	97	314	37
CK425	Reserva/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	140	111	265	93	314	38
CK83	Ipiranga/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	140	111	261	91	314	43
CK85	Ipiranga/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	140	111	261	91	314	43(clone)

CK6	Cândido Abreu/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	265	89	314	47
CK10	Cândido Abreu/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	265	89	314	47(clone)
CK204	Mandirituba/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	263	91	314	48
CK219	Frei Rogério/SC	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	265	93	314	49
CK321	São Joaquim/SC	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	265	91	314	50
CK325	São Joaquim/SC	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	140	111	265	91	314	50(clone)
CK8	Cândido Abreu/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	140	111	265	89	316	53
CK23	Laranjal/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	140	111	265	91	314	54
CK403	Victor Meireles/SC	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	140	111	265	91	314	54(clone)
CK11	Cândido Abreu/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	140	111	265	91	314	39
CK51	Inácio Martins/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	140	111	265	89	314	40
CK196	Tijucas do Sul/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	140	111	265	93	314	38
CK575	Vale Verde/RS	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	231	174	140	111	265	91	314	62

CK579	Vale Verde/RS	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	231	174	140	111	265	91	314	62(clone)
CK136	Guaraqueçaba/PR	#19	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	144	111	265	91	314	41
CK13	Cândido Abreu/PR	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	364	165	278	356	229	174	140	111	265	89	314	64
CK591	São Lourenço do Sul/RS	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	364	165	278	356	229	174	140	111	263	91	314	65
CK592	São Lourenço do Sul/RS	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	364	165	278	356	229	174	140	111	263	91	314	65(clone)
CK593	São Lourenço do Sul/RS	#19	Não-arquétipo	291	242	205	160	364	165	278	356	229	174	140	111	263	91	314	65(clone)
CK17	Sta. Maria do Oeste/PR	#19	South American 3	291	242	205	162	362	165	278	356	227	174	140	111	265	89	314	66
CK96	Imbaú/PR	#21	Não-arquétipo	291	242	207	160	362	165	278	356	225	174	140	105	263	91	314	67
CK531	Capão Bonito do Sul/RS	#21	Não-arquétipo	291	242	207	160	358	165	278	356	227	170	140	105	261	91	314	69
CK534	Capão Bonito do Sul/RS	#21	Não-arquétipo	291	242	207	160	358	165	278	356	227	170	140	105	261	91	314	69(clone)
CK388	Alfredo Wagner/SC	#26	Não-arquétipo	289	248	209	160	336	165	278	356	211	190	149	111	267	87	306	70
CK185	Agudos do Sul/PR	#53	Não-arquétipo	289	242	205	156	362	165	278	356	225	170	153	109	307	91	314	72
CK187	Agudos do Sul/PR	#53	Não-arquétipo	289	242	205	156	362	165	278	356	225	170	153	109	307	91	314	72(clone)
CK188	Agudos do Sul/PR	#53	Não-arquétipo	289	242	205	156	362	165	278	356	225	170	153	109	307	91	314	72(clone)
CK198	Agudos do Sul/PR	#53	Não-arquétipo	289	242	205	162	342	165	278	356	233	164	159	111	295	93	339	73
CK295	São Cristovão/SC	#53	Não-arquétipo	289	242	205	162	342	165	278	356	237	164	153	111	295	93	341	74

CK566	Barros Cassal/RS	#87	Não-arquétipo	289	248	209	160	336	165	278	356	213	190	145	109	261	87	308	71
CK252	Bandeirante/SC	#116	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	169	278	356	213	192	142	111	263	109	314	75
CK545	Quatro Irmãos/RS	#116	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	169	278	356	213	192	142	111	267	97	314	76
CK597	São Lourenço do Sul/RS	#116	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	169	278	356	213	192	142	111	263	105	314	77
CK599	São Lourenço do Sul/RS	#116	Não-arquétipo	289	242	205	160	348	169	278	356	213	192	142	111	263	105	314	77(clone)
CK418	Pirapó/RS	#116	Não-arquétipo	289	242	205	160	352	169	278	356	215	192	142	111	263	101	314	78
CK558	Ibirapuitã/RS	#135	Não-arquétipo	287	246	203	160	348	165	278	356	213	190	142	111	295	89	314	79
CK65	Ivaí/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	149	113	265	91	314	44
CK67	Ivaí/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	149	113	265	91	314	44(clone)
CK148	Guaraqueçaba/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	147	111	261	91	314	45
CK150	Guaraqueçaba/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	174	147	111	261	91	314	45(clone)
CK195	Mandirituba/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	223	178	160	111	265	91	312	46
CK62	Imbituva/PR	#162	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	149	111	267	91	316	51
CK58	Imbituva/PR	#162	South American	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	149	111	267	91	316	55

CK66	Ivaí/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	149	113	265	91	314	56
CK199	Tijucas do Sul/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	149	111	265	93	314	57
CK87	Tibagi/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	151	111	267	91	314	58
CK189	Mandirituba/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	153	111	265	89	314	59
CK105	Cerro Azul/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	153	111	265	89	314	59(clone)
CK115	Itaperuçu/PR	#162	Não-arquétipo	291	242	205	160	366	165	278	356	227	174	153	111	265	91	314	80
CK118	Itaperuçu/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	157	111	267	93	334	60
CK202	Mandirituba/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	157	111	265	91	314	61
CK205	Mandirituba/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	227	174	157	111	265	91	314	61 (clone)
CK172	Tijucas do Sul/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	229	174	149	111	265	89	314	42
CK151	Guaraqueçaba/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	231	174	155	111	263	91	314	63
CK154	Guaraqueçaba/PR	#162	4 South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	231	174	155	111	263	91	314	63(clone)
CK274	Irineópolis/SC	#162	Não-arquétipo	291	242	205	162	366	165	278	356	231	164	162	111	263	91	312	81

CK186	Agudos do Sul/PR	#163	Não-arquétipo	291	242	205	160	336	165	278	356	213	192	149	113	265	91	312	82
CK393	Alfredo Wagner/SC	#163	Não-arquétipo	291	242	207	160	342	165	278	356	223	190	142	105	263	93	310	83
CK458	São Vicente do Sul/RS	#163	Não-arquétipo	291	242	207	166	342	165	278	356	221	172	142	105	263	97	310	84
CK557	Ibirapuitã/RS	#163	Não-arquétipo	289	242	203	156	340	165	278	356	213	170	142	111	261	93	312	85
CK48	Inácio Martins/PR	#173	Não-arquétipo	289	238	207	160	334	169	272	356	219	164	138	113	322	89	320	86
CK351	Canelinha/SC	#173	Não-arquétipo	289	242	207	160	342	169	276	356	211	184	140	107	316	83	328	87
CK385	Alfredo Wagner/SC	#173	Não-arquétipo	291	242	207	164	362	169	272	356	223	172	142	111	322	95	334	88
CK387	Alfredo Wagner/SC	#173	Não-arquétipo	291	242	207	164	362	169	272	356	223	172	142	111	322	95	334	88(clone)
CK390	Alfredo Wagner/SC	#173	Não-arquétipo	291	242	207	164	362	169	272	356	223	172	142	111	322	95	334	88 (clone)
CK106	Cerro Azul/PR	#175	Não-arquétipo	289	242	205	160	344	165	278	356	225	190	142	111	295	91	330	89
CK102	Tibagi/PR	#206	Não-arquétipo	291	242	207	162	342	165	278	358	227	164	166	107	295	95	308	90
CK184	Agudos do Sul/PR	#206	Não-arquétipo	291	242	207	162	342	165	278	358	223	164	164	107	297	91	308	91
CK242	Caxambu do Sul/SC	#236	Não-arquétipo	291	240	205	160	362	165	278	356	227	174	142	111	297	105	339	92
CK49	Inácio Martins/PR	#246	Não-arquétipo	289	242	207	164	346	167	276	356	207	170	136	119	322	83	308	93
CK50	Inácio Martins/PR	#246	Não-arquétipo	289	242	207	164	346	167	276	356	207	170	136	119	322	83	308	93(clone)
CK52	Inácio Martins/PR	#246		289	242	207	164	346	167	276	356	207	170	136	119	322	83	308	93(clone)

CK486	Herval/RS	#271	Não-arquétipo	291	242	205	160	342	165	278	356	211	190	142	111	279	89	306	94
CK315	Painel/SC	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	265	87	306	95
CK337	Bom Retiro/SC	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	265	87	306	95(clone)
CK84	Ipiranga/PR	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	267	87	306	96
CK499	Maquiné/RS	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	267	87	306	96(clone)
CK314	Painel/SC	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	269	87	306	97
CK338	Bom Retiro/SC	#278	Não-arquétipo	289	248	205	160	336	165	278	356	213	166	147	109	273	87	306	98
CK372	Leoberto Leal/SC	Novo1	Não-arquétipo	289	242	205	162	360	171	276	358	213	164	140	109	312	89	312	99
CK44	Inácio Martins/PR	Novo2	Não-arquétipo	289	242	205	162	366	165	278	358	227	164	140	111	265	103	314	100
CK55	Imbituva/PR	Novo3	Não-arquétipo	289	242	207	160	338	169	272	358	241	178	142	115	312	89	308	101
CK100	Tibagi/PR	Novo4	Não-arquétipo	291	242	207	160	362	165	278	356	227	176	140	105	267	93	314	102
CK280	Irineópolis/SC		Caribbean 1	291	242	205	162	342	165	278	356	225	164	140	111	263	89	314	103
CK103	Tibagi/PR	Novo5	Não-arquétipo	289	242	205	166	338	169	272	360	229	172	153	111	310	91	306	104
CK119	Itaperuçu/PR	Novo6	South American 2	289	242	205	162	344	165	278	358	213	164	145	111	265	87	306	29

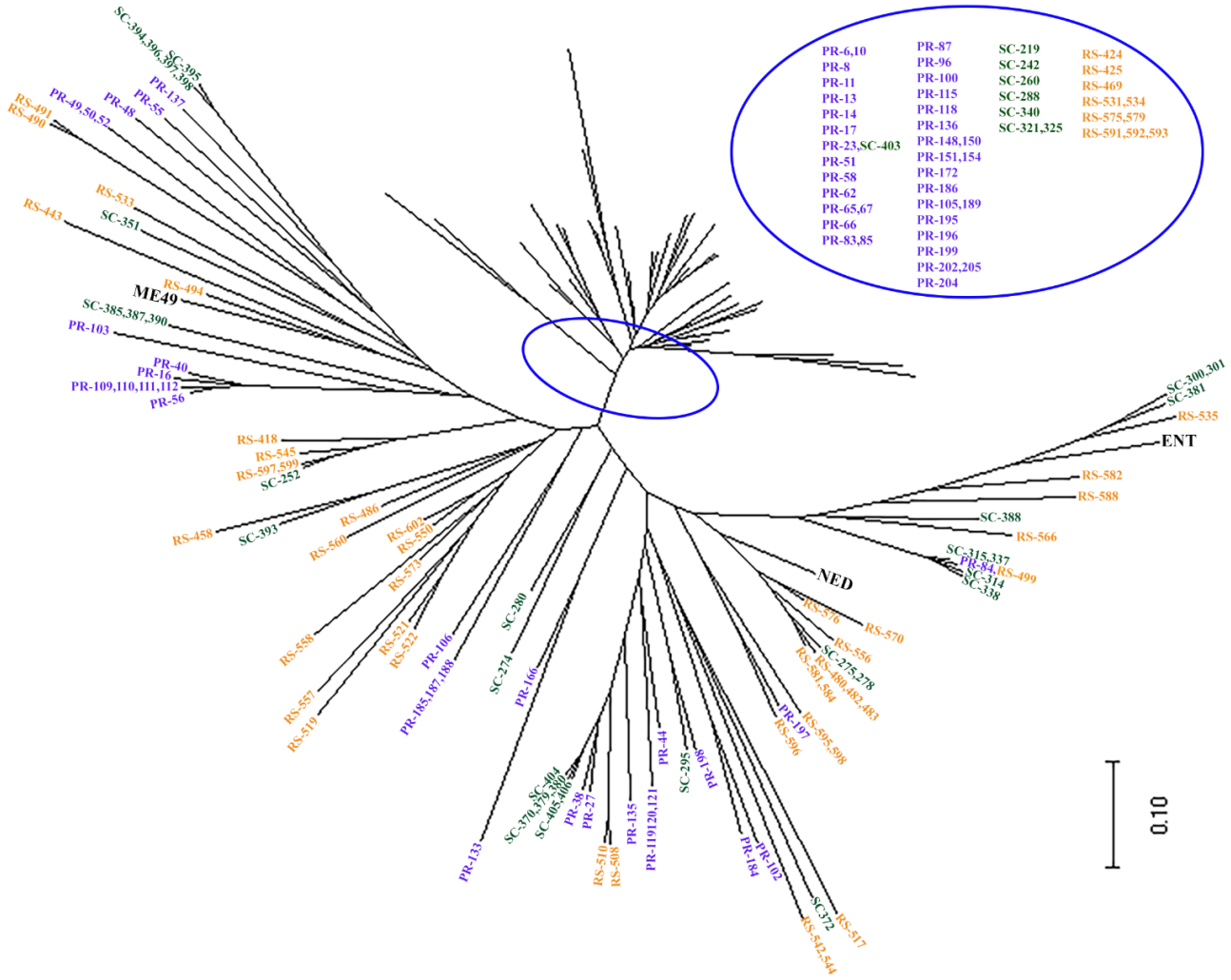
CK120	Itaperuçu/PR	Novo6	South American 2	289	242	205	162	344	165	278	358	213	164	145	111	265	87	306	29(clone)
CK121	Itaperuçu/PR	Novo6	South American 2	289	242	205	162	344	165	278	358	213	164	145	111	265	87	306	29(clone)
CK137	Guaraqueçaba/PR	Novo7	Não-arquétipo	289	242	207	162	334	169	276	356	215	174	142	123	314	101	310	105
CK166	PR-Antonina/PR	Novo8	Não-arquétipo	291	242	205	160	342	165	278	354	239	166	140	111	263	89	308	106
CK288	Santa Cecília/SC	Novo9	South American 4	291	242	205	160	362	165	278	356	225	174	149	111	265	89	314	52
CK394	José Boiteux/SC	Novo10	Não-arquétipo	289	242	207	162	338	169	276	356	233	164	142	113	312	95	347	107
CK396	José Boiteux/SC	Novo10	Não-arquétipo	289	242	207	162	338	169	276	356	233	164	142	113	312	95	347	107(clone)
CK397	José Boiteux/SC	Novo10	Não-arquétipo	289	242	207	162	338	169	276	356	233	164	142	113	312	95	347	107(clone)
CK398	José Boiteux/SC	Novo10	Não-arquétipo	289	242	207	162	338	169	276	356	233	164	142	113	312	95	347	107(clone)
CK395	José Boiteux/SC	Novo 10	Não-arquétipo	289	242	207	162	338	169	276	356	231	164	142	113	312	95	347	108
CK490	Herval/RS	Novo11	Não-arquétipo	289	246	205	164	340	167	274	354	213	178	136	113	318	115	308	109
CK491	Herval/RS	Novo11	Não-arquétipo	289	246	205	164	340	167	274	354	213	178	136	113	318	113	308	110
CK533	Capão Bonito do Sul/RS	Novo11	Não-arquétipo	289	242	207	160	350	167	274	360	239	184	140	111	316	97	316	111
CK508	São José dos Ausentes/RS	Novo12	Não-arquétipo	289	248	205	162	336	165	278	358	211	164	142	111	263	113	312	112

CK510	São José dos Ausentes/RS	Novo12	Não-arquétipo	289	248	205	162	336	165	278	358	211	164	142	111	263	109	312	113
CK542	Machadinho/RS	Novo13	Não-arquétipo	291	242	205	162	352	169	276	358	223	178	138	113	314	87	316	114
CK544	Machadinho/RS	Novo13	Não-arquétipo	291	242	205	162	352	169	276	358	223	178	138	113	314	87	316	114(clone)
CK560	Barros Cassal/RS	Novo14	Não-arquétipo	291	242	205	166	348	165	278	356	229	172	142	111	305	89	312	115
CK582	Dom Feliciano/RS	Novo15	Não-arquétipo	289	248	209	160	342	165	278	358	211	166	145	109	269	87	306	116
CK588	Dom Feliciano/RS	Novo15	Não-arquétipo	289	242	209	160	336	169	274	356	211	192	145	109	269	87	306	117
CK443	Barra do Quaraí/RS	Novo16	Não-arquétipo	287	242	207	158	354	169	274	356	221	168	153	109	297	89	322	118
CK595	São Lourenço do Sul/RS	Novo17	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	231	164	147	109	316	85	308	10
CK598	São Lourenço do Sul/RS	Novo17	Tipo III	289	242	205	160	336	165	278	356	231	164	147	109	316	85	308	10(clone)

*TOXO-DB (http://toxodb.org/toxo/) e http://web.utk.edu/~csu1/Toxoplasma.html

Fonte: Alves (2021).

Figura 15 – Relação genealógica das amostras de *Toxoplasma gondii* das galinhas do Rio Grande do Sul usando resultados da análise de Microssatélites. Os números representam a identidade das galinhas. ENT, ME-49 e NED são amostras de referência dos tipos clonais I, II e III. PR=Paraná (cor roxa), SC=Santa Catarina (cor verde) e RS=Rio Grande do Sul (cor roxa). O círculo azul corresponde às amostras do Tipo América do Sul 4, que formaram um único cluster.



Fonte: Alves (2021).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada uma metodologia de colheita de amostras baseada no IDH dos municípios; o critério foi estabelecido como uma forma de dividir o estado e padronizar as colheitas, visto que o estudo abrangeu uma área muito grande e o objetivo principal era de um conjunto de isolados de *T. gondii* representativos para a região. Como o IDH dos municípios representa o grau de desenvolvimento a partir de indicadores de desempenho pré-estabelecidos e relacionados à saúde, educação e renda (SCARPIM; SLOMSKI, 2007), acreditou-se que seriam áreas em que seria mais fácil encontrar galinhas de criação caipira, já que não há fontes oficiais com este tipo de dado. No decorrer das colheitas, foi possível perceber que mesmo em cidades de baixo IDH, não era fácil encontrar essas criações. Explorar áreas que não eram conhecidas, muitas vezes sem sinalização de limites de municípios nas estradas e, aleatoriamente, buscar essas pequenas criações, que tivessem os critérios estipulados para inclusão e onde as pessoas concordassem em vender galinhas, muitas vezes foram fatores que dificultaram a colheita.

Relativamente ao sorodiagnóstico, no estado do Paraná, foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* em 51,4% das galinhas coletadas (214 galinhas). Garcia et al. (2000), na cidade de Jaguapitã, localizada no norte do estado, avaliou a sorologia de 155 galinhas de criações domésticas e observou a soroprevalência de 10,3% (16 aves). No mesmo estado, Dubey et al. (2003) avaliaram a sorologia de galinhas de criação caipira na cidade de Santa Isabel do Ivaí situada no noroeste do estado e encontraram uma prevalência de 40%, o teste sorológico foi o mesmo, porém utilizaram o ponto de corte 1:5; se fosse considerado o ponto de corte utilizado no presente estudo (1:10), a prevalência seria de 32,5%. Mais recentemente, Vieira et al. (2018) em estudo no nordeste do Paraná, utilizando o ponto de corte 1:16 (MAT) avaliaram 386 galinhas e 64 (16,6%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii*. Com isso, é possível constatar que a soroprevalência observada no Paraná no presente estudo foi superior ao encontrado anteriormente, essa diferença pode estar relacionada à região do estado, visto que o presente estudo abrangeu o centro, sul e litoral do Paraná, enquanto os demais estudos foram realizados na região norte e noroeste do estado.

No estado de Santa Catarina, foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* em 52,1% das galinhas coletadas (192 galinhas). Trevisani et al. (2017) coletaram amostras de sangue de 133 galinhas caipiras em seis mesorregiões de Santa Catarina e avaliaram a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), obtendo 84 aves (63,16%) positivas. No mesmo estado, Pena et al. (2018) avaliaram a soroprevalência de *T. gondii* em 21 galinhas da ilha de Florianópolis por meio do MAT, ponto de corte 1:5, e 52,4% (11 aves) foram positivas; se fosse considerado o ponto de corte utilizado no presente estudo (1:10), a prevalência seria de 38,1%.

No estado do Rio Grande do Sul, foram encontrados anticorpos anti-*T. gondii* em 61,2% das galinhas coletadas (201 galinhas). Camillo et al. (2015) ao avaliarem 137 galinhas caipiras, por meio da RIFI (ponto de corte 1:16) detectaram 62% (85 aves) positivas para anticorpos anti-*T. gondii*, resultado semelhante ao do presente estudo.

A soroprevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras também apresenta grande variabilidade nas demais regiões do Brasil; no arquipélago de Fernando de Noronha, localizado no Nordeste, foi realizada a colheita de sangue de todas as galinhas adultas da localidade (430 amostras) e foi observada uma soroprevalência de *T. gondii* de 88,4% (380 galinhas), por meio da RIFI (ponto de corte 1:16). Em Alagoas, localizada na mesma região do Brasil, foram coletadas 200 galinhas e 72 (36%) apresentaram anticorpos anti-*T. gondii* por meio da RIFI (ponto de corte 1:16) (DOS SANTOS SILVA et al., 2020). No Sudeste, na cidade de Uberlândia, estado de Minas Gerais, foi avaliada a soroprevalência de *T. gondii* em 108 galinhas de vida livre (MAT, ponto de corte 1:16) e 71,3% (77 aves) foram positivas (LOPES et al., 2016). Na mesma região, em três municípios do Espírito Santo, Ferreira et al. (2018) avaliaram a soroprevalência de *T. gondii* em 58 galinhas por meio do Teste de Hemaglutinação indireto (ponto de corte1:32) e 13 (22,4%) aves foram positivas. Holsback et al. (2012) ao avaliar a presença de anticorpos anti-*T. gondii* em 40 galinhas caipiras em Aquidauana e Rio Verde do Mato Grosso, no Mato Grosso do Sul encontraram uma ocorrência de 67,5% (27 aves) por meio do MAT (ponto de corte 1:5).

Em outros países, a soroprevalência de *T. gondii* em galinhas caipiras também é variável, sendo observadas diferentes prevalências em estudos realizados

na Argentina (53%), Austrália (90%), China (2,2% – 67,1%), Egito (8,6 – 69,5%), Itália (36,4%) e Estados Unidos (19,4%) (DUBEY et al., 2020).

Os resultados de prevalência de *T. gondii* obtidos nos estudos sorológicos são difíceis de serem comparados por utilizarem diferentes testes sorológicos para detecção e diferentes pontos de corte (DUBEY et al., 2020), além disso, o critério de colheita de amostras é variável entre as pesquisas, assim como a área de captação de animais é muitas vezes realizada por conveniência.

No presente estudo, o bioensaio foi realizado em galinhas com títulos de anticorpos ≥ 20, pois embora títulos de anticorpos = 10 sejam indicativos de exposição, a taxa de isolamento é baixa (DUBEY et al., 2006b, 2006c; DUBEY; LAURIN; KWOWK, 2016). Avaliando a Região Sul, *T. gondii* foi isolado de 52,6% (160/304) das galinhas com título ≥ 20 e o sucesso de isolamento foi maior com o aumento dos títulos de anticorpos. Ao analisar cada estado, no Paraná e Rio Grande do Sul foi possível observar a mesma associação, porém em Santa Catarina não houve associação. O aumento do sucesso de isolamento associado com o título de anticorpos também foi observado por Pena et al. (2006) e Ragozo et al. (2008). Desta forma, utilizar um ponto de corte mais alto para tentativa de isolamento do agente foi uma decisão para diminuir e otimizar o uso de camundongos na pesquisa, além de reduzir os custos e o trabalho e ainda obter uma alta taxa de isolamento.

A virulência de *T. gondii* pode ser influenciada pelo genótipo do parasita, além de outros fatores como estágio do parasita, dose, e susceptibilidade natural do hospedeiro. Em estudos anteriores, ela era avaliada pela taxa de mortalidade em camundongos infectados (PENA et al., 2006; YAI et al., 2009; VITALIANO et al., 2014), porém, atualmente, por questões éticas, os camundongos devem ser eutanasiados quando estão em sofrimento, logo, os camundongos eram acompanhados diariamente para acompanhamento dos sinais clínicos e realização da eutanásia quando apresentassem sinais compatíveis com a infecção. A avaliação da virulência no presente estudo, foi avaliada pelo tempo PI em que o animal apresentou esse conjunto de sinais; observou-se que os camundongos que apresentaram quadro clínico agudo de toxoplasmose tiveram um tempo de sobrevida menor quanto aos que apresentaram quadros crônicos da doença, uma vez que a mediana foi de 19,3 e 26,2 dias, respectivamente.

Por meio da genotipagem por PCR-RFLP, o presente estudo demostrou a alta diversidade genotípica de isolados de *T. gondii* na Região Sul, visto que, foram

identificados 41 diferentes genótipos, sendo que destes, 17 são caracterizados como novos genótipos não-arquétipos, ou seja, que não haviam sido descritos anteriormente. Assim, pode-se dizer que numa única região brasileira, com apenas um estudo, mais genótipos foram revelados do que os que já foram descritos em diversos países também da América do Sul, como Argentina, Chile, Colômbia, Guiana, Peru e Venezuela até o momento (RAJENDRAN; SU; DUBEY, 2012; DUBEY et al., 2020).

No estado do Paraná, não foi isolada nenhuma amostra com genótipo clonal clássico (Tipo I, II e III), já no estado de Santa Catarina, o Tipo I foi encontrado em três galinhas e o Tipo III em duas aves. No estado do Rio Grande do Sul, foram isolados os três tipos clonais clássicos: o Tipo I de uma galinha, o Tipo II variante também de uma galinha e o Tipo III de cinco aves.

No Brasil, o Tipo I foi descrito anteriormente apenas na Região Sul, em amostras de galinhas de vida livre (DUBEY et al., 2007b; PENA et al., 2018) e em um gato (PENA et al., 2017) nos mesmos estados em que o presente estudo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O Tipo II variante foi descrito no nordeste do Brasil, na ilha de Fernando de Noronha em amostras de diferentes espécies (galinha, gato e rato - *Rattus rattus*) (DUBEY et al., 2010; SILVA et al., 2017) e em dois ovinos do Rio Grande do Sul (DA SILVA et al., 2011). O Tipo III apresenta uma distribuição maior, já tendo sido descrito em amostra de um cão no Mato Grosso, na Região Centro-Oeste (WITTER et al., 2020); de uma galinha em Fernando de Noronha, no Nordeste (DUBEY et al., 2010); na Região Sudeste, de um cão (DUBEY et al., 2007a) e de cinco capivaras (YAI et al., 2009) em São Paulo, de uma galinha (SILVA et al., 2014) em Minas Gerais e de duas galinhas no Rio de Janeiro (DUBEY et al., 2003, 2008; SHWAB et al., 2014; CASARTELLI-ALVES et al., 2015), e na Região Sul, no Rio Grande do Sul, em três galinhas (DUBEY et al., 2008). O presente estudo, demonstrou a ocorrência dos tipos clonais nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo que o Tipo I apresenta circulação apenas na Região Sul, não sendo isolado, até o momento, em outros estados.

É notável que mesmo com 20 anos de estudos de genotipagem e quase 1.000 amostras genotipadas, a Região Sul, particularmente Santa Catarina e Rio Grande do Sul, continue sendo a principal área de circulação das amostras clonais clássicas, e, de qualquer forma, ainda em número bem reduzido, enfatizando o sucesso da expansão das amostras não-arquétipas no território nacional,

provavelmente relacionada com a provável origem de *T. gondii* na América do Sul (BERTRANPETIT et al., 2017).

As linhagens recombinantes de *T. gondii*, não-arquétipas, consideradas linhagens clonais brasileiras (Tipos BrI, BrII e BrIII) e isoladas anteriormente em diferentes regiões, também foram observadas no presente estudo. O Tipo BrI (#6) foi isolado de oito galinhas do Paraná, o Tipo BrII (#11) de apenas uma ave no Paraná e uma no Rio Grande do Sul e o Tipo BrIII (#8) de seis galinhas de Santa Catarina e cinco do Rio Grande do Sul, demonstrando a elevada circulação dessas linhagens também na Região Sul.

O genótipo não-arquétipo Tipo BrIV (#17) foi isolado de uma galinha do estado de Santa Catarina e de duas do Rio Grande do Sul, esse achado corrobora com os achados de genotipagem de isolados de galinhas (DUBEY et al., 2007b). Além disso, demonstra a circulação dessa linhagem na Região Sul, visto que foi isolado anteriormente de dois ovinos oriundos de matadouros que recebiam animais da Região Sul e Sudeste do Brasil (DA SILVA et al., 2011) e dois ovinos de cidades próximas aos locais de coleta do presente estudo (RAMOS et al., 2018). Previamente incluída como uma provável linhagem clonal brasileira (PENA et al., 2008), este genótipo, com estudos posteriores, revelou se tratar de uma linhagem de circulação local, particularmente na Região Sul.

Este estudo é o primeiro a descrever os genótipos #116 e #135 na Região Sul, apesar de eles terem sido isolados em diferentes regiões do Brasil (DUBEY et al., 2006a, 2008; RAGOZO et al., 2010; SHWAB et al., 2014; FEITOSA et al., 2016, 2017). Os genótipos #162, #173, #206, #236 e #246 (BRANDÃO et al., 2006; DUBEY et al., 2006a, 2008; YAI et al., 2009; BELTRAME et al., 2012; CABRAL et al., 2013; CARNEIRO et al., 2013; SILVA et al., 2014; VITALIANO et al., 2014; DA SILVA; LANGONI, 2016; FERREIRA et al., 2018) haviam sido descritos apenas na Região Sudeste e o presente estudo demonstrou a circulação desses tipos também na Região Sul.

O genótipo #87, isolado no presente estudo de uma galinha do Rio Grande do Sul, foi identificado anteriormente no mesmo estado parasitando uma galinha (DUBEY et al., 2008) e uma perdiz (CASAGRANDE et al., 2015); o genótipo #271, isolado de um animal no presente estudo, também foi relatado anteriormente apenas no Rio Grande do Sul, parasitando um ovino (RAMOS et al., 2018) indicando a circulação de ambos os genótipos no estado. O genótipo #278 havia sido descrito

apenas em uma galinha em Santa Catarina (PENA et al., 2018), o presente estudo demonstrou a circulação do genótipo nos três estados da Região Sul.

Assim, de maneira geral, o presente estudo contribuiu para expandir o conhecimento sobre a circulação de diferentes genótipos não-arquétipos no território nacional.

Shwab et al. (2014) avaliaram a distribuição de 189 genótipos PCR-RFLP em cinco regiões geográficas do mundo (África, Ásia, Europa, América do Norte e Américado Sul/Central) e identificaram como os mais frequentes no mundo: #2 (Tipo III), #3 (Tipo II variante), #1 (Tipo II), #5, #9, #6, #7, #8 (Tipo BrIII) e #10 (Tipo I), em ordem decrescente de frequência. No presente estudo, obteve-se isolamento dos genótipos #2, #3, #6, #8 e #10, demonstrando que os genótipos de maior circulação no mundo estão presentes na Região Sul do Brasil. No mesmo estudo, ao avaliarem 646 amostras provenientes da América Central e América do Sul, observaram 156 genótipos, sendo que os mais frequentes foram #2 (Tipo II), #6, #7, #8, #11 (Tipo BrII), #3 (Tipo II variante), #65, #13, #19 e #146, em ordem decrescente de frequência. No presente trabalho, os genótipos #2, #6, #8, #11 e #19 também foram encontrados na Região Sul do Brasil, corroborando com o descrito anteriormente.

A construção de uma rede filogenética com todos 200 genótipos PCR-RFLP descritos, incluindo os do presente estudo, além de enfatizar a alta diversidade de *T. gondii*, mostra a estruturação das populações em três grupos e ainda corrobora com a alta divergência das amostras Tipo II e Tipo II variante.

A variação alélica do marcador CS3 (PCR-RFLP) pode indicar a virulência de isolados não-arquétipos, sendo descrita essa associação em trabalhos realizados anteriormente (PENA et al., 2008; YAI et al., 2009; DUBEY et al., 2010; RAGOZO et al., 2010; VITALIANO et al., 2014), porém, no presente trabalho não foi observada essa relação, corroborando com o observado por Araújo et al. (2010), Cabral et al., (2013) e Gennari et al. (2015).

A genotipagem por MS, como era esperado, apresentou uma maior variabilidade de genótipos. Esse maior poder de resolução da análise por MS sobre a tipagem por PCR-RFLP se deve ao fato de os microssatélites serem marcadores que consistem em pequenas sequências repetitivas de dois a seis nucleotídeos (SSR), que evoluem muito mais rapidamente do que marcadores baseados em Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) como a PCR-RFLP. Assim, mesmo que

isolados possam exibir a mesma tipagem por meio da PCR-RFLP, eles provavelmente terão diferenças em um lócus com taxa evolutiva mais alta.

As amostras que foram idênticas nos 15 marcadores de MS (possíveis clones da mesma amostra), em sua maioria ocorreram em amostras de galinhas da mesma propriedade, porém o subtipo 59 foi isolado de duas cidades diferentes do estado do Paraná, Mandirituba e Cerro Azul, que ficam distantes cerca de 130 km uma da outra. Em Santa Catarina, o subtipo 17 foi isolado de Leoberto Leal e José Boiteux (110 km de distância) e o subtipo 95 foi encontrado em Painel e Bom Retiro (100 km de distância). Também foi observado o mesmo subtipo em diferentes estados: o subtipo 54 foi isolado de uma cidade do Paraná (Laranjal) e uma de Santa Catarina (Vitor Meireles) e o subtipo 96 foi observado em uma cidade no Paraná (Ipiranga) e uma do Rio Grande do Sul (Maquiné) 507, em ambos os casos as cidades ficam distantes mais de 500 km. Estas situações podem indicar amostras independentes do mesmo genótipo, e não clones circulantes. No estudo da relação genealógica das amostras obtidas utilizando os dados de MS, observou-se também a alta diversidade dos isolados obtidos na Região Sul.

7 CONCLUSÕES

Com base no presente estudo, conclui-se que:

- *Toxoplasma gondii* está distribuído amplamente em galinhas caipiras nos estados da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande no Sul).
- A seleção de galinhas com títulos ≥20 (MAT) é uma boa estratégia para o isolamento de amostras representativas de *T. gondii*.
- A variabilidade genotípica de *T. gondii* encontrada nos isolados de galinhas caipiras da Região Sul é extremamente alta, e inclui a ocorrência dos Tipos clonais clássicos I, II e III.
- Assim como em outras regiões do Brasil, circula na Região Sul os tipos clonais brasileiros BrI, BrII e BrIII, demonstrando sua ampla distribuição no território nacional.
- A genotipagem por MS apresenta melhor resolução do que a PCR-RFLP para identificar variabilidade genotípica em uma região.

REFERÊNCIAS

AJZENBERG, D. et al. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 27–38, 2002.

AJZENBERG, D. et al. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. **International journal for parasitology**, v. 34, p. 1185–96, 2004.

AJZENBERG, D. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4641–5, dez. 2010.

ARAÚJO, J. B. et al. Isolation and multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* in seronegative rodents in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3–4, p. 328–331, 2010.

BELTRAME, M. A. V. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espírito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, p. 225–230, 2012.

BERTRANPETIT, E. et al. Phylogeography of *Toxoplasma gondii* points to a South American origin. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 150–155, 2017.

BONNA, I. C. F. et al. Estudo soroepidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 186–189, 2006.

BRANDÃO, G. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* from domestic animals from Minas Gerais, Brazil. **Parasite**, v. 13, n. 2, p. 143–149, 2006.

CABRAL, A. D. et al. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). **Veterinary Parasitology**, v. 193, p. 100–104, 2013.

CAMILLO, G. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in backyard chickens in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola**, v. 17, n. 2, p. 263–265, 2015.

CARNEIRO, A. C. A. V. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 901–7, 2013.

CASAGRANDE, R. A. et al. Fatal systemic toxoplasmosis in Valley quail (*Callipepla californica*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 264–267, 2015.

CASARTELLI-ALVES, L. et al. Mapping of the environmental contamination of *Toxoplasma gondii* by georeferencing isolates from chickens in an endemic area in Southeast Rio de Janeiro State, Brazil. **Geospatial Health**, v. 10, n. 1, p. 20–

25, 2015.

DA SILVA, R. C. et al. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: New atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**, v. 175, p. 173–177, 2011.

DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Risk factors and molecular typing of *Toxoplasma gondii* isolated from ostriches (*Struthio camelus*) from a Brazilian slaughterhouse. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 73–80, 2016.

DE-LA-TORRE, A.; LÓPEZ-CASTILLO, C. A.; GÓMEZ-MARÍN, J. E. Incidence and clinical characteristics in a Colombian cohort of ocular toxoplasmosis. **Eye**, v. 23, p. 1090–1093, 2009.

DE OLIVEIRA, L. N. et al. *Toxoplasma gondii* isolates from free-range chickens from the Northeast Region of Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 235–237, 2009.

DOS SANTOS SILVA, A. C. et al. Occurrence of atypical and new genotypes of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens intended for human consumption in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 65, n. 3, p. 774–778, 2020.

DUBEY, J. P. Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: Stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradvzoites of different strains of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 592–602, 1997.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75–77, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 229–234, nov. 2003

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Amazon, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 36–40, 2006a.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Chile, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 76–82, 2006b.

DUBEY, J. P. et al. Biologic and genetic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Nicaragua, Central America. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1–2, p. 47–53, 2006c.

DUBEY, J. P. et al. Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 60–64, 2007a.

DUBEY, J. P. et al. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Pará state and the southern

state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. **Veterinary parasitology**, v. 143, n. 2, p. 182–8, 2007b.

DUBEY, J. P. et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 157, p. 299–305, 2008.

DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis of animals and humans**. 2nd Editio ed. Florida: CRC Press, 2010.

DUBEY, J. P. et al. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: Unexpected findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 709–712, 2010b.

DUBEY, J. P. et al. Epidemiologic significance of *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): The past decade. **Parasitology**, v. 147, n. 12, p. 1263–1289, 2020.

DUBEY, J. P.; DESMONTS, G. Serological responses of equids fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Equine Veterinary Journal**, v. 19, n. 4, p. 1987, 1987.

DUBEY, J. P.; LAURIN, E.; KWOWK, O. C. H. Validation of the modified agglutination test for the detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens by using cat and mouse bioassay. **Parasitology**, v. 143, p. 314–319, 2016.

FEITOSA, T. F. et al. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. **Parasitology Research**, v. 115, p. 3983–3990, 2016.

FEITOSA, T. F. et al. High genetic diversity in *Toxoplasma gondii* isolates from pigs at slaughterhouses in Paraíba state, northeastern Brazil: Circulation of new genotypes and Brazilian clonal lineages. **Veterinary Parasitology**, v. 244, p. 76–80, 2017.

FERREIRA, T. C. R. et al. *Toxoplasma gondii*: Isolation, biological and molecular characterisation of samples from free-range *Gallus gallus domesticus* from countryside Southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 3, p. 384–389, 2018.

GARCIA, J. L. et al. Soroprevalência do *Toxoplasma gondii* em galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de criações domésticas, oriundas de propriedades rurais do Norte do Paraná, Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 123–127, 2000.

GENNARI, S. M. et al. Occurrence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and its isolation and genotyping in donkeys, mules, and horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 209, p. 129–132, 2015.

GILBERT, R. E. et al. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 8, p. e277, 2008.

GLASNER, P. D. et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, p. 136–144,

1992.

HAMIDINEJAT, H. et al. Comparison of three diagnostic methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in free range chickens. **Tropical biomedicine**, v. 31, n. 3, p. 507–513, 2014.

HOLSBACK, L. et al. Serologic and molecular diagnostic and bioassay in mice for detection of *Toxoplasma gondii* in free ranges chickens from Pantanal of Mato Grosso do Sul. v. 32, n. 8, p. 721–726, 2012.

HOWE, D. K. et al. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1411–1414, 1997.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561–1566, 1995.

HUSON, D. H. SplitsTree: Analyzing and visualizing evolutionary data. **Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 68–73, 1998.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–267, 2006.

JASP TEAM. **JASP Team (2020). JASP (Version) [Compute software].** AmsterdamCopyright University of Amsterdam., 2020. .

KHAN, A. et al. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 942–949, 2006.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LANGELLA, O. **Populations 1.2.28: A Population Genetic Software.** Boston, 1999.

LOPES, C. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlândia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865–1875, 2016.

OWEN, M. R.; TREES, A. J. Genotyping of *Toxoplasma gondii* associated with abortion in sheep. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 2, p. 382–384, 1999.

PENA, H. F. de J. et al. Fatal toxoplasmosis in an immunosuppressed domestic cat from Brazil caused by *Toxoplasma gondii* clonal type I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 26, n. 2, p. 177–184, 2017.

PENA, H. F. J. et al. *Toxoplasma gondii* infection in cats from São Paulo state, Brazil: Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 58–

67, 2006.

PENA, H. F. J. et al. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 5, p. 561–9, abr. 2008.

PENA, H. F. J. et al. Free-range chickens from Santa Catarina state, southern Brazil, as asymptomatic intermediate hosts for *Toxoplasma gondii* clonal type I and typical Brazilian genotypes. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 55–59, 2018.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** Vienna, AustriaR Foundation for Statistical Computing, 2021.

RAGOZO, A. M. A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from sheep from São Paulo State, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 6, p. 1259–1263, 2008.

RAGOZO, A. M. A. et al. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 307–312, 2010.

RAJENDRAN, C.; SU, C.; DUBEY, J. P. Molecular genotyping of *Toxoplasma gondii* from Central and South America revealed high diversity within and between populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 359–368, 2012.

RAMOS, T. da S. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from herds of sheep in southern Brazil reveals the archetypal type II genotype and new non-archetypal genotypes. **Parasitology International**, v. 67, n. 1, p. 59–63, 2018.

RODRIGUES, F. T. et al. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in slaughtered free-range and broiler chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 51–53, 2019.

RUDZINSKI, M. et al. Reactivation of ocular toxoplasmosis in non-hispanic persons, Misiones Province, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 912–913, 2016.

SCARPIM, J. E.; SLOMSKI, V. Estudo dos fatores condicionantes do índice de desenvolvimento humano nos municípios do estado do Paraná: instrumento de controladoria para a tomada de decisões na gestão governamental. **Revista de Administração Pública**, v. 41, n. 5, p. 909–933, 2007.

SHWAB, E. K. et al. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. **Parasitology**, v. 141, n. 4, p. 453–61, abr. 2014.

SILVA, J. C. R. et al. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II-variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 4–9, 2017.

SILVA, L. A. et al. Overlapping *Toxoplasma gondii* genotypes circulating in domestic animals and humans in Southeastern Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–

7, 2014.

SIMPSON, E. H. Measurment of Diversity. **Nature**, v. 688, n. 1943, 1949.

SU, C. et al. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 137, p. 1–11, 2010.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J. P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 841–8, jun. 2006.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217–1258, 2000.

TREVISANI, N. et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from naturally infected *Gallus domesticus* in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 139–145, 2017.

VIEIRA, F. E. G. et al. *Toxoplasma gondii*: prevalence and characterization of new genotypes in free-range chickens from south Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 3, p. 681–688, 2018.

VITALIANO, S. N. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International journal for parasitology: Parasites and wildlife**, v. 3, p. 276–83, dez. 2014.

WITTER, R. et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* in the Midwestern Brazil revealed high genetic diversity and new genotypes. **Acta Tropica**, v. 212, p. 105681, 2020.

YAI, L. E. O. et al. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 162, p. 332–337, 10 jun. 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Amostras de *Toxoplasma* gondii descritas no Brasil de acordo com o respectivo genótipo PCR-RFLP (PCR-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA), região, estado e espécie hospedeira.

Identificação da amostra	**Genótipo PCR-RFLP***	**Região**	**Estado**	**Espécie**	**Nº de amostras**	**Referência**
TgBoBr1, 2	**#001, Type II clonal**	Sul	Santa Catarina	Bovino	2	Macedo et al. 2012
TgNmBr1	**#001, Type II clonal**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha d'angola	1	Dubey et al. 2011
TgOvBrRS4	**#001, Type II clonal**	Sul	Rio Grande do Sul	Ovino	1	Ramos et al. 2018
TgDoveBr1, 2, 8, 9	**#001, Type II clonal**	Sul	Paraná	Pomba	4	Barros et al. 2014
TgDgBrMT1	**#002, Type III**	Centro-Oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgDgBr11	**#002, Type III**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgCpBr2, 4, 5,6, 7	**#002, Type III**	Sudeste	São Paulo	Capivara	5	Yai et al. 2009
TgCkBr231	**#002, Type III**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	1	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
TgCkBr31, 56	**#002, Type III**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr158, 161, 164	**#002, Type III**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	3	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
CH6	**#002, Type III**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014

TgCkBr221, 225, 226, 228, 230	**#003, Type II variant**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	5	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
TgCatBrFN1	**#003, Type II variant**	Nordeste	Fernando de Noronha	Gato	1	Silva et al. 2017
TgOvBr2, 5	**#003, Type II variant**	Sul	Rio Grande do Sul	Ovino	2	Silva et al. 2011
TgRatnoBrFN1	**#003, Type II variant**	Nordeste	Fernando de Noronha	Roedor	1	Silva et al. 2017
TgGtBr2, 3, 4, 9	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Cabra	4	Ragozo et al. 2010
TgDgBrMT2	**#006, Type BrI**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgDgBr3, 7	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Cão	2	Dubey et al. 2007a
TgDgBr20	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Pena et al. 2014
TgCpBr 14	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgCkBr265, 273, 277, 281	**#006, Type BrI**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	4	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBrEs4, 5	**#006, Type BrI**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	2	Ferreira et al. 2018
TgCkBrMA4	**#006, Type BrI**	Nordeste	Maranhão	Galinha	1	Sousa et al. 2016
TgCkBr201, 203, 207	**#006, Type BrI**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	3	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
CH4, CH5	**#006, Type BrI**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	2	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgChBrUD2	**#006, Type BrI**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Lopes et al. 2016
TgCkBr144	**#006, Type BrI**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014

TgCkBr98, 101, 102, 104	**#006, Type BrI**	Sul	Paraná	Galinha	4	Dubey et al. 2003d, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrPr2, 3	**#006, Type BrI**	Sul	Paraná	Galinha	2	Vieira et al. 2018
TgCkBr55, 79, 86, 87	**#006, Type BrI**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	4	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr123, 124	**#006, Type BrI**	Norte	Rondônia	Galinha	2	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr10	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr4	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Dubey et al. 2020
TgCatBr 2, 12, 17, 21, 30	**#006, Type BrI**	Sul	Paraná	Gato	5	Su et al. 2006
TgCatBr 42, 47, 53, 54, 55, 62, 71, 75	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Gato	8	Pena et al. 2008
Ct534 (DNA)	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Humano	1	Ferreira et al. 2011
PS-batB1466	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Morcego	1	Cabral et al. 2021
TgShBr8, 9, 10, 11,	**#006, Type BrI**	Sudeste	São Paulo	Ovino	4	Ragozo et al. 2010
TgDoveBr7	**#006, Type BrI**	Sul	Paraná	Pomba	1	Barros et al. 2014
TgSbaBr2	**#006, Type BrI**	Sudeste	Minas Gerais	Tatupeba	1	Vitaliano et al. 2014
TgCkBrMT40,42,49,51	**#006, Type BrI**	Centro-Oeste	Mato Grosso	Galinha	4	Witter et al. 2021
TgCkBr182	**#007**	Nordeste	Ceará	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014

TgCkBrMA2,3	**#007**	Nordeste	Maranhão	Galinha	2	Sousa et al. 2016
TgCkBr196	**#007**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCkBr111, 112	**#007**	Norte	Pará	Galinha	2	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCefBrMT1,2	**#008, Type BrIII**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cachorro-do-mato	2	Witter et al. 2020
D8	**#008, Type BrIII**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	1	Silva et al. 2014
TgDgBr4, 12	**#008, Type BrIII**	Sudeste	São Paulo	Cão	2	Dubey et al. 2007a
TgCpBr 17, 18, 20, 36	**#008, Type BrIII**	Sudeste	São Paulo	Capivara	4	Yai et al. 2009
PS-TgRabbitBrRS1	**#008, Type BrIII**	Sul	Rio Grande do Sul	Coelho	1	Nascimento et al. 2017
TgWildBrMG5	**#008, Type BrIII**	Sudeste	Minas Gerais	Corujinha-do-mato	1	Rêgo et al. 2018
TgCkBr194, 195	**#008, Type BrIII**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	2	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
CH12	**#008, Type BrIII**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgCkBrPB30	**#008, Type BrIII**	Nordeste	Paraíba	Galinha	1	Feitosa et al. 2016, 2017
TgCkBr131,132, 133, 134	**#008, Type BrIII**	Norte	Rondônia	Galinha	4	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr7, 11, 17	**#008, Type BrIII**	Sudeste	São Paulo	Galinha	3	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCatBr 3, 4	**#008, Type BrIII**	Sul	Paraná	Gato	2	Su et al. 2006

TgCatBr58, 59, 60, 73, 74	**#008, Type BrIII**	Sudeste	São Paulo	Gato	5	Pena et al. 2008
TgCTBr05	**#008, Type BrIII**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
PS-TgLonloBrPE1	**#008, Type BrIII**	Nordeste	Pernambuco	Lontra	1	Silva et al. 2018
TgShBr15	**#008, Type BrIII**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Ragozo et al 2010
TgAagBrMT1, TgOceBrMT1, TgRhaBrMT1	**#008, Type BrIII**	Centro-oeste	Mato Grosso	Silvestres	3	Witter et al. 2020
TgPigBrPB19	**#008, Type BrIII**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgCkBr285, 286	**#008, TypeBrIII**	Nordeste	Bahia	Galinha	2	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCkBrMT27,28,29,30,31,44,47	**#008, TypeBrIII**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	7	Witter et al. 2021
PS-TgPigBrPB1, PS-TgPigBrPB2	**#009**	Nordeste	Paraíba	Suíno	2	Olinda et al. 2016
TgCkBr146	**#010, Type I**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrSC1	**#010, Type I**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Pena et al. 2018
PS-TgCatBrSC1	**#010, Type I**	Sul	Santa Catarina	Gato	1	Pena et al. 2017
PS-TgBHmBr1	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Bugio	1	Vitaliano et al. 2014
D3,4	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	2	Silva et al. 2014
TgDgBr1, 13	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Cão	2	Dubey et al. 2007a
TgCpBr11, 23, 24	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Capivara	3	Yai et al. 2009
TgRabbitBr2	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Coelho	1	Dubey et al. 2011b
CH7, 9, 10, 11	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	4	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgChBrUD1	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Lopes et al. 2016
TgCkBrPB9	**#011, Type BrII**	Nordeste	Paraíba	Galinha	1	Feitosa et al. 2016, 2017

TgCkBr97	**#011, Type BrII**	Sul	Paraná	Galinha	1	Dubey et al. 2003d, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr57, 64	**#011, Type BrII**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBrSM03,04 (Pains1, 2)	**#011, Type BrII**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	2	Camillo et al. 2020
TgCatBr1, 7,	**#011, Type BrII**	Sul	Paraná	Gato	2	Su et al. 2006
TgCatBr 39, 51, 52, 56, 61, 68, 77, 78	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Gato	8	Pena et al. 2008
TgCTBr02,08, 09,11,14,20,27	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	7	Carneiro et al. 2013
TgMWBr1	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Lobo-guará	1	Vitaliano et al. 2014
PS-TgTmoBrMG1	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Macaco-guigó	1	Santana et al. 2020
TgOvBr3	**#011, Type BrII**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Silva et al 2011
TgWildBrMG3	**#011, Type BrII**	Sudeste	Minas Gerais	Pica-pau-do-campo	1	Rêgo et al. 2018
TgCkBrMT37,39,43	**#011, Type BrII**	Centro-Oeste	Mato Grosso	Galinha	3	Witter et al. 2021
TgRhHmBr1	**#013**	Nordeste	Pernambuco	Bugio	1	Pena et al. 2011
TgGtBr10	**#013**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Cabra	1	Ragozo et al. 2010
TgCeFBr1	**#013**	Nordeste	Pernambuco	Cachorro-do-mato	1	Almeida et al. 2017
TgWildBrMG6	**#013**	Sudeste	Minas Gerais	Carcará	1	Rêgo et al. 2018
TgCkBr184, 185	**#013**	Nordeste	Alagoas	Galinha	2	de Oliveira et al. 2009;

						Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr174,176	**#013**	Nordeste	Bahia	Galinha	2	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr288, 289, 290, 291, 292, 293	**#013**	Nordeste	Bahia	Galinha	6	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCkBr179, 180	**#013**	Nordeste	Ceará	Galinha	2	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrPB3, 10, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27	**#013**	Nordeste	Paraíba	Galinha	14	Feitosa et al. 2016, 2017
TgCkBr165	**#013**	Nordeste	Pernambuco	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr167, 170	**#013**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Galinha	2	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr183	**#013**	Nordeste	Sergipe	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgRatraBrFN1	**#013**	Nordeste	Fernando de Noronha	Rato preto	1	Silva et al. 2017
TgButstBrPE1	**#013**	Nordeste	Pernambuco	Socozinho	1	Silva et al. 2018

TgPigBrPB17, 18, 20, 27	**#013**	Nordeste	Paraíba	Suíno	4	Feitosa et al. 2017b
TgPgBrRN4	**#013**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Suíno	1	Clementino et al. 2013
TgDgBr19	**#014**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgDgBrMT3	**#014**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgCkBr236, 237, 241	**#014**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	3	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBr82, 90	**#014**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr153	**#014**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCatBr15	**#014**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
TgPwBrMT1	**#014**	Centro-oeste	Mato Grosso	Humano	1	Witter et al. 2020
isolates 143;146	**#014**	Sul	Paraná	Roedor	2	Ruffolo et al. 2016
TgCkBrMT21	**#014**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCkBr119, 120, 122, 129, 135, 137, 140	**#015**	Norte	Rondônia	Galinha	7	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr81	**#017, Type BrIV**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr147, 148, 151, 154, 160, 162, 163	**#017, Type BrIV**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	7	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014

TgOvBrRS2, 3	**#017, Type BrIV**	Sul	Rio Grande do Sul	Ovino	2	Ramos et al. 2018
TgOvBr1,6	**#017, Type BrIV**	Sudeste	São Paulo	Ovino	2	Silva et al. 2011
TgDoveBr11	**#017, Type BrIV**	Sul	Paraná	Pomba	1	Barros et al. 2014
TgCpBr10, 31	**#019**	Sudeste	São Paulo	Capivara	2	Yai et al. 2009
TgRabbitBr1	**#019**	Sudeste	Minas Gerais	Coelho	1	Dubey et al. 2011b
TgCkBr205, 209	**#019**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	2	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
CH2, CH3	**#019**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	2	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgCkBrPr5	**#019**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgCkBr28, 33, 50, 52, 58	**#019**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	5	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCatBr5, 11, 16	**#019**	Sul	Paraná	Gato	3	Su et al. 2006
TgCatBr84	**#019**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgBatBr2	**#019**	Sudeste	São Paulo	Morcego	1	Cabral et al. 2012
TgOvBr4	**#019**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Silva et al. 2011
MM03	**#019**	Sul	Paraná	Rato	1	Araújo et al. 2010
TgCkBrMT34	**#019**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCpBr29	**#021**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgCkBr95	**#021**	Sul	Paraná	Galinha	1	Dubey et al. 2003d, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrPr7, 13	**#021**	Sul	Paraná	Galinha	2	Vieira et al. 2018

TgCatBr10, 22, 23, 28, 31, 32, 37	**#021**	Sul	Paraná	Gato	7	Su et al. 2006
PS-TgBraarBrSP1	**#021**	Sudeste	São Paulo	Muriqui	1	Santos et al. 2017
RR09 (*Rattus rattus*)	**#021**	Sul	Paraná	Rato preto	1	Araújo et al. 2010
isolados 60,61 (*Rattus rattus*)	**#021**	Sul	Paraná	Rato preto	2	Ruffolo et al. 2016
TgCkBr27, 38, 44, 51, 65, 66, 78, 80	**#022**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	8	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr110	**#025**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBr149, 150, 152, 157	**#026**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	4	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrSC2	**#026**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Pena et al. 2018
Ck32, 35	**#026**	Sul	Santa Catarina	Galinha	2	Trevisani et al. 2017
TgCatBr65, 66	**#026**	Sudeste	São Paulo	Gato	2	Pena et al. 2008
TgCkBr115, 142, 145	**#028**	Norte	Pará	Galinha	3	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBr114	**#029**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBr113	**#030**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgDgBr8, 9, 10	**#032**	Sudeste	São Paulo	Cão	3	Dubey et al. 2007a
TgCpBr34, 35	**#033**	Sudeste	São Paulo	Capivara	2	Yai et al. 2009
TgCkBr41, 42, 49, 60, 62	**#033**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	5	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014;

						Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgDgBr5	**#034**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgCpBr8, 13, 15	**#034**	Sudeste	São Paulo	Capivara	3	Yai et al. 2009
TgCatBr44, 48, 69, 70	**#034**	Sudeste	São Paulo	Gato	4	Pena et al. 2008
TgCkBr307	**#036**	Nordeste	Bahia	Galinha	1	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCkBrEs2, 3	**#036**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	2	Ferreira et al. 2018
TgCkBr30, 34, 59, 67	**#036**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	4	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCTBr18	**#036**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
PS-TgHmoBrMG1,2,3,4,5,6,7	**#036**	Sudeste	Minas Gerais	Silvestre	7	Santana et al. 2020
TgCkBr32, 36, 84, 85	**#037**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	4	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr75, 76, 92	**#040**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	3	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgDgBrMT4	**#041**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgCpBr9, 12	**#041**	Sudeste	São Paulo	Capivara	2	Yai et al. 2009

TgCkBr136, 138, 139	**#041**	Norte	Rondônia	Galinha	3	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCT15, 23	**#041**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	2	Carneiro et al. 2013
TgCkBrMT7	**#041**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCatBr9, 19	**#042**	Sul	Paraná	Gato	2	Su et al. 2006
TgCkBr117, 126, 127	**#045**	Norte	Rondônia	Galinha	3	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr99, 100	**#047**	Sul	Paraná	Galinha	2	Dubey et al. 2003, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCatBr25	**#047**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
TgCkBr181	**#048**	Nordeste	Ceará	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrPB4, 5, 6	**#048**	Nordeste	Paraíba	Galinha	3	Feitosa et al. 2016, 2017
TgDgBr6, 17	**#051**	Sudeste	São Paulo	Cão	2	Dubey et al. 2007a
TgCkBr46	**#051**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgDgBr14, 15	**#053**	Sudeste	São Paulo	Cão	2	Dubey et al. 2007a
TgCpBr19, 21, 22	**#053**	Sudeste	São Paulo	Capivara	3	Yai et al. 2009
TgCkBr96	**#053**	Sul	Paraná	Galinha	1	Dubey et al. 2003, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBrSC3	**#053**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Pena et al. 2018
Ck103	**#053**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Trevisani et al. 2017

TgCkBrSM01 (SF306)	**#055**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Camillo et al. 2020
TgCatBr79, 80	**#055**	Sudeste	São Paulo	Gato	2	Pena et al. 2008
TgCatBr45, 46	**#056**	Sudeste	São Paulo	Gato	2	Pena et al. 2008
TgCkBr171, 172	**#057**	Nordeste	Maranhão	Galinha	2	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgDgBr2	**#058**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgCatBr83	**#058**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr40, 47	**#059**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr13, 23	**#063**	Sudeste	São Paulo	Galinha	2	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr6	**#063**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b, 2020
TgCkBrSM02 (SF1)	**#064**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Camillo et al. 2020
TgCkBr19, 24	**#064**	Sudeste	São Paulo	Galinha	2	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr280	**#065**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	1	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBr89	**#065**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015

TgCatBr82	**#065**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
DNA human	**#065**	Sudeste	São Paulo	Humano	12	Ferreira et al. 2011
TgDoveBr12	**#065**	Sul	Paraná	Pomba	1	Barros et al. 2014
TgDgBr16	**#067**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgCpBr33	**#067**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgCatBr76	**#067**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCTBr07	**#067**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCkBr93, 94	**#069**	Sul	Paraná	Galinha	2	Dubey et al. 2003d, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr21	**#069**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b, 2020
PS-BatM48B651	**#069**	Sudeste	São Paulo	Morcego	1	Cabral et al. (2021)
TgCkBr107, 108	**#070**	Norte	Pará	Galinha	2	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBr26, 69	**#071**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr71	**#071**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a, 2020
Ct180 - human DNA	**#071**	Sudeste	São Paulo	Humano	1	Ferreira et al. 2011
TgCkBr272	**#075**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	1	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBr48, 88	**#075**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	2	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014;

						Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr155, 159	**#076**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	2	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr141	**#077**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBr169	**#078**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCatBr26	**#080**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
TgCkBr173	**#081**	Nordeste	Bahia	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr54	**#082**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCatBr72	**#085**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCatBr50	**#086**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr156	**#087**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Dubey et al. 2007b, 2008b; Shwab et al. 2014
PS-TgValquBr1	**#087**	Sul	Rio Grande do Sul	Perdiz	1	Casagrande et al. 2015
TgCkBr186	**#088**	Nordeste	Alagoas	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014

TgCkBrPB28, 29	**#088**	Nordeste	Paraíba	Galinha	2	Feitosa et al. 2016, 2017
TgCatBr40	**#092**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr61	**#093**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCkBr16	**#094**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr109	**#096**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgCkBrMT6	**#099**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCatBr34	**#104**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
TgCkBr143	**#105**	Norte	Pará	Galinha	1	Dubey et al. 2007b; Shwab et al. 2014
TgDgBr18	**#106**	Sudeste	São Paulo	Cão	1	Dubey et al. 2007a
TgCkBr37	**#107**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
D2, D5	**#108**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	2	Silva et al. 2014
TgCpBrMT1	**#108**	Centro-oeste	Mato Grosso	Capivara	1	Witter et al. 2020
TgCkBr234, 235, 238, 239, 240, 242, 243, 247, 248, 253, 254, 255, 256, 261, 262, 263, 264	**#108**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	17	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCatBr57	**#108**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008

TgWildBrMG1	**#108**	Sudeste	Minas Gerais	Gavião-carijó	1	Rêgo et al. 2018
TgCTBr04, 17	**#108**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	2	Carneiro et al. 2013
SAF, RAR	**#108**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	2	Silva et al. 2014
TgCkBr177	**#109**	Nordeste	Ceará	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr249, 250, 252	**#109**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	3	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBrMA1	**#109**	Nordeste	Maranhão	Galinha	1	Sousa et al. 2016
TgPigBrPB24	**#109**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgPgBrRN1	**#109**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Suíno	1	Clementino et al. 2013
TgCkBrMT10,11,12,13	**#109**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	4	Witter et al. 2021
TgCkBrPr4, 15	**#111**	Sul	Paraná	Galinha	2	Vieira et al. 2018
TgCatBr64	**#111**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgShBr6, 7, 16	**#111**	Sudeste	São Paulo	Ovino	3	Ragozo et al. 2010
TgOvBr12	**#111**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Silva et al. 2011
TgRatnoBr1	**#111**	Sudeste	São Paulo	Rato	1	Muradian et al. 2012
TgCkBrAL02	**#114**	Nordeste	Alagoas	Galinha	1	Ribeiro-Andrade et al. 2019
TgCkBr166	**#114**	Nordeste	Pernambuco	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgPigBrPB16	**#114**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017
TgCkBrPB1, 2	**#116**	Nordeste	Paraíba	Galinha	2	Feitosa et al. 2016, 2017

TgCkBr130	**#116**	Norte	Rondônia	Galinha	1	Dubey et al. 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgPigBrPB11	**#116**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgPgBrRN2	**#116**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Suíno	1	Clementino et al. 2013
TgCkBrMT48	**#116**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCatBr41	**#117**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCatBr18	**#119**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
Ck89, 102	**#120**	Sul	Santa Catarina	Galinha	2	Trevisani et al. 2017
TgCatBr20	**#120**	Sul	Paraná	Gato	1	Su et al. 2006
TgCatBr67	**#121**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr296, 301, 305, 308	**#122**	Nordeste	Bahia	Galinha	4	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCatBr81	**#124**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr8	**#125**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr168	**#129**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgCkBr178	**#134**	Nordeste	Ceará	Galinha	1	de Oliveira et al. 2009; Dubey et al. 2008b; Shwab et al. 2014
TgGtBr8	**#135**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Cabra	1	Ragozo et al. 2010

TgCkBr45	**#135**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgCatBr38	**#136**	Sudeste	São Paulo	Gato	1	Pena et al. 2008
TgCkBr74	**#138**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a; Shwab et al. 2014; Casartelli-Alves et al. 2014, 2015
TgDgBrMT8	**#140**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgCkBrSM05 (SF439)	**#140**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Camillo et al. 2020
TgCatBrMT1	**#140**	Centro-oeste	Mato Grosso	Gato	1	Witter et al. 2020
TgCkBrMT1,3	**#140**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	2	Witter et al. 2021
TgCkBr222	**#142**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	1	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
TgShBr1, 2	**#144**	Sudeste	São Paulo	Ovino	2	Ragozo et al. 2010
TgOpBr1	**#145**	Sudeste	São Paulo	Gamba	1	Pena et al. 2011
TgCkAL01	**#146**	Nordeste	Alagoas	Galinha	1	dos Santos Silva et al. 2020
TgCkBr210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 223, 224, 227, 229, 233	**#146**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	15	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
PS-TgCaEgBr1, PS-TgCaEgBr2	**#146**	Nordeste	Fernando de Noronha	Garça	2	Vitaliano et al. 2014
TgCatBrPE1, 2	**#146**	Nordeste	Fernando de	Gato	2	Melo et al. 2016

			Noronha			
TgShBrFN1	**#146**	Nordeste	Fernando de Noronha	Ovino	1	Melo et al. 2020
TgRatnoBrFN2	**#146**	Nordeste	Fernando de Noronha	Rato	1	Silva et al. 2017
TgPgBrFN1	**#146**	Nordeste	Fernando de Noronha	Suíno	1	Melo et al. 2020
TgCpBr26	**#148**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgGtBr1, 6, 7, 12	**#149**	Sudeste	São Paulo	Cabra	4	Ragozo et al. 2010
TgGtBr5	**#150**	Sudeste	São Paulo	Cabra	1	Ragozo et al. 2010
TgShBr3, 4	**#150**	Sudeste	São Paulo	Ovino	2	Ragozo et al. 2010
TgCkBrPr10	**#152**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgShBr12, 13, 14	**#152**	Sudeste	São Paulo	Ovino	3	Ragozo et al. 2010
TgCkBr232	**#153**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	1	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
TgCkBr202, 204	**#157**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	2	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCkBr206	**#158**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCkBr200	**#159**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgShBr5	**#160**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Ragozo et al. 2010

TgCkBr199	**#161**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCpBr1	**#162**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgCkBr267, 268, 269, 270, 271	**#162**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	5	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCTBr12	**#162**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgBatBr1	**#162**	Sudeste	São Paulo	Morcego	1	Cabral et al. 2012
TgDonkeyBrI	**#163**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Burro	1	Gennari et al. 2015
TgCkBr220	**#163**	Nordeste	Fernando de Noronha	Galinha	1	Dubey et al. 2010; Shwab et al. 2014
CH1	**#163**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgCkBrRN1, 2, 3, 4, 10, 12, 13	**#163**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Galinha	7	Clementino et al. 2013
TgCkBrSM09 (BM)	**#163**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	1	Camillo et al. 2020
TgCkBr208	**#164**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCpBr27	**#165**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgDgBrMT5,6	**#166**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	2	Witter et al. 2020
TgCTBraI, TgCTBrac, TgCTBrv	**#166**	Sul	Paraná	Humano	3	Higa et al. 2014
TgPwBrMT2	**#166**	Centro-oeste	Mato Grosso	Humano	1	Witter et al. 2020
TgJagBr1	**#166**	Nordeste	Pernambuco	Jaguarundi	1	Pena et al. 2011

TgCantBrMT1	**#166**	Centro-oeste	Mato Grosso	Silvestre	1	Witter et al. 2020
TgCkBrMT2,4,22,23,24,25,26,45,46	**#166**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	9	Witter et al. 2021
TgOvBr7, 8	**#171**	Sudeste	São Paulo	Ovino	2	Silva et al. 2011
TgCkBr188, 189, 190, 191, 192, 193	**#172**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	6	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCpBr3	**#173**	Sudeste	São Paulo	Capivara	1	Yai et al. 2009
TgCkBr197	**#174**	Centro-oeste	Mato Grosso do Sul	Galinha	1	Soares et al. 2011; Holsback et al. 2012; Shwab et al. 2014
TgCpBr25, 30	**#175**	Sudeste	São Paulo	Capivara	2	Yai et al. 2009
TgCkBrPr8	**#175**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgLWpBr1	**#175**	Sudeste	São Paulo	Pica-pau	1	Vitaliano et al. 2014
TgDoveBr6,10	**#182**	Sul	Paraná	Pomba	2	Barros et al. 2014
TgCTBrca	**#184**	Sul	Paraná	Humano	1	Higa et al. 2014
TgDgBrMT7	**#190**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgCkBrMT20	**#190**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
PS-TgSpPBr1	**#195**	Norte	Pará	Paca	1	Vitaliano et al. 2014
TgNbaBr2, TgNbaBr3	**#195**	Norte	Pará	Tatu	2	Vitaliano et al. 2014
TgWlpBr2	**#196**	Norte	Pará	Queixada	1	Vitaliano et al. 2014
TgPigBrPB15	**#203**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgOsBr1	**#206**	Sudeste	São Paulo	Avestruz	1	Silva e Langoni 2016
TgCkBr244, 245, 246, 278, 279	**#206**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	5	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBrEs1	**#206**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	1	Ferreira et al. 2018

CH8	**#206**	Sudeste	Minas Gerais	Galinha	1	Brandão et al. 2006; Silva et al. 2014
TgCT01,03,25	**#206**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	3	Carneiro et al. 2013
EFP	**#206**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Silva et al. 2014
TgCTBr13	**#208**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCTBr21	**#209**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCTBr22	**#210**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCTBr24	**#211**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCTBr26	**#212**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Carneiro et al. 2013
TgCkBr258, 259, 260	**#213**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	3	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBr257	**#214**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	1	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgCkBr274	**#215**	Sudeste	Espírito Santo	Galinha	1	Beltrame et al. 2012; Pena et al. 2013
TgGtBrRN1	**#217?**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Cabra	1	Clementino et al. 2013
TgPgRN3	**#217?**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Suíno	1	Clementino et al. 2013
TgPgBrRN5	**#218?**	Nordeste	Rio Grande do Norte	Suíno	1	Clementino et al. 2013
D1	**#226**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	1	Silva et al. 2014
D6	**#227**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	1	Silva et al. 2014
TgCkBr3	**#227**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a,

						2008b, 2020
D7	**#228**	Sudeste	Minas Gerais	Cão	1	Silva et al. 2014
TgHorseBrRS1	**#228**	Sul	Rio Grande do Sul	Equino	1	Pena et al. 2018
EGS	**#229**	Sudeste	Minas Gerais	Humano	1	Silva et al. 2014
TgCantBr1	**#231**	Norte	Pará	Tamanduá	1	Vitaliano et al. 2014
TgNbaBr1	**#231**	Norte	Pará	Tatu	1	Vitaliano et al. 2014
TgWlpBr1	**#232**	Norte	Pará	Queixada	1	Vitaliano et al. 2014
TgWlpBr3	**#233**	Norte	Pará	Queixada	1	Vitaliano et al. 2014
TgCantBr2	**#234**	Norte	Pará	Tamanduá	1	Vitaliano et al. 2014
TgCkBr294, 295	**#235**	Nordeste	Bahia	Galinha	2	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgOncBr1	**#235**	Nordeste	Pernambuco	Gato-do-mato	1	Vitaliano et al. 2014
TgCantBr3	**#236**	Sudeste	São Paulo	Tamanduá	1	Vitaliano et al. 2014
TgHoFBr1	**#237**	Sudeste	São Paulo	Raposa do campo	1	Vitaliano et al. 2014
PS-TgNbaBr4	**#238**	Norte	Pará	Tatu	1	Vitaliano et al. 2014
PS-TgTinBr1	**#239**	Sudeste	São Paulo	Perdiz	1	Vitaliano et al. 2014
TgSpPBr2	**#240**	Norte	Pará	Paca	1	Vitaliano et al. 2014
PS-TgSbaBr1	**#241**	Centro-Oeste	Mato Grosso	Tatupeba	1	Vitaliano et al. 2014
TgCkBr83	**#242**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a, 2020
TgCkBr63	**#243**	Sudeste	Rio de Janeiro	Galinha	1	Dubey et al. 2003a, 2006a, 2020

TgCkBr18	**#244**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b, 2020
TgCkBr5	**#245**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b, 2020
TgCkBr14	**#246**	Sudeste	São Paulo	Galinha	1	Dubey et al. 2002, 2006a, 2008b, 2020
TgCkBrPr16	**#248**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgCkBrPr11	**#251**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgCkBrPr14	**#252**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
TgCkBrPr17	**#253**	Sul	Paraná	Galinha	1	Vieira et al. 2018
PS-Lw#31Tn	**#255**	Sul	Rio Grande do Sul	Gato-maracajá	1	Cânon-Franco et al. 2013
PS-Py#21Sm	**#256**	Sul	Rio Grande do Sul	Jaguarundi	1	Cânon-Franco et al. 2013
TgCkBr282	**#257**	Norte	Amazonas	Galinha	1	Vitaliano et al. 2015
TgCkBr283	**#258**	Norte	Amazonas	Galinha	1	Vitaliano et al. 2015
TgCkBrMA5	**#269**	Nordeste	Maranhão	Galinha	1	Sousa et al. 2016
TgOvBrRS1	**#270**	Sul	Rio Grande do Sul	Ovino	1	Ramos et al. 2018
TgOvBrRS5	**#271**	Sul	Rio Grande do Sul	Ovino	1	Ramos et al. 2018
TgPigBrPB3, 26	**#272**	Nordeste	Paraíba	Suíno	2	Feitosa et al. 2017b
TgCkBrPB11, 12, 14	**#273**	Nordeste	Paraíba	Galinha	3	Feitosa et al. 2016, 2017
TgPigBrPB9, 21	**#273**	Nordeste	Paraíba	Suíno	2	Feitosa et al. 2017b
TgCkBrPB26	**#274**	Nordeste	Paraíba	Galinha	1	Feitosa et al. 2016, 2017
TgPigBrPB8	**#274**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al 2017b
TgPigBrPB10	**#275**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgPigBrPB12	**#276**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b

TgCkBrPB7, 8	**#277**	Nordeste	Paraíba	Galinha	2	Feitosa et al. 2016, 2017
TgPigBrPB23	**#277**	Nordeste	Paraíba	Suíno	1	Feitosa et al. 2017b
TgCkBrAL01	**#277**	Nordeste	Alagoas	Galinha	1	Ribeiro-Andrade et al. 2019
TgCkAL02	**#277**	Nordeste	Alagoas	Galinha	1	dos Santos Silva et al. 2020
TgCkBrSC4	**#278**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Pena et al. 2018
TgCkBrRS20, 21	**#280**	Sul	Rio Grande do Sul	Galinha	2	Vielmo et al. 2019
TgWildBrMG4	**#290**	Sudeste	Minas Gerais	Carcará	1	Rêgo et al. 2018
TgWildBrMG2	**#290**	Sudeste	Minas Gerais	Tucano	1	Rêgo et al. 2018
PS-TgBaledBrES1	**#300**	Sudeste	Espírito Santo	Baleia Bryde	1	Días-Delgado et al. 2020
TgPkSMBra - DNA	**#301**	Sul	Rio Grande do Sul	Suíno	3	Paraboni et al. 2019
TgCkBr302	**#302**	Nordeste	Bahia	Galinha	1	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCkBr303	**#303**	Nordeste	Bahia	Galinha	1	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
TgCkBr304	**#304**	Nordeste	Bahia	Galinha	1	Costa et al. 2008; Gonçalves et al. 2012; Rocha et al. 2018
Ck56	**#305**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Trevisani et al. 2017
Ck127	**#306**	Sul	Santa Catarina	Galinha	1	Trevisani et al. 2017
TgOvBr13	**#307**	Sudeste	São Paulo	Ovino	1	Silva et al. 2011
TgDgBrMT9	**#310**	Centro-oeste	Mato Grosso	Cão	1	Witter et al. 2020
TgBfCuBrMT1	**#311**	Centro-oeste	Mato Grosso	Silvestre	1	Witter et al. 2020

TgHumIMTBr1	**#312**	Sudeste	São Paulo	Humano	1	Pena et al. 2021
TgCkBrMT14,15,16,17,18,19	**#313**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	6	Witter et al. 2021
TgCkBrMT5	**#314**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCkBrMT36	**#315**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCkBrMT32	**#316**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
TgCkBrMT35	**#317**	Centro-oeste	Mato Grosso	Galinha	1	Witter et al. 2021
P.1,P.2	**StaMaria-2018**	Sul	Rio Grande do Sul	Humano	2	Minuzzi et al. 2020

***** TOXO-DB (http://toxodb.org/toxo/) e http://web.utk.edu/~csu1/Toxoplasma.html

ANEXO B – **Galinhas caipiras coletadas na Região Sul do Brasil, nas quais foi realizado o bioensaio em camundongos, título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (Teste de Aglutinação Modificado/MAT), quadro clínico apresentado pelos camundongos inoculados, isolamento do agente e genotipagem do isolado por meio da PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de DNA) e análise de Microssatélites (MS).**

Galinha	Estado	Cidade	Título (MAT ≥10)	Quadro clínico# cam1/cam2/cam3	Infetados/ inoculados	Eutanásia pós-infecção (dias) ¥	Isolamento&	Genotipagem PCR-RFLP	Genotipagem MS
CK2	PR	Reserva	640	ag	1/2	24	1	#19	Não-arquétipo
CK6	PR	Cândido Abreu	1280	ag/ag	2/2	21/s	1	#19	South American 4
CK7	PR	Cândido Abreu	40	-	-	-	0	-	-
CK8	PR	Cândido Abreu	640	ag	1/2	23	1	#19	South American 4
CK9	PR	Cândido Abreu	640	-	-	-	0	-	-
CK10	PR	Cândido Abreu	640	ag	1/2	s	1	#19	Não-arquétipo
CK11	PR	Cândido Abreu	640	ag/ag	2/2	19/21	1	#19	South American 4
CK12	PR	Cândido Abreu	80	-	-	-	0	-	-
CK13	PR	Cândido Abreu	80	ag/cr	2/2	24/30	1	#19	Não-arquétipo
CK14	PR	Sta. Maria do Oeste	80	ag/ag	2/2	18/23	1	#19	Não-arquétipo
CK16	PR	Sta. Maria do Oeste	1280	ag/cr	2/2	24/s	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK17	PR	Sta. Maria do Oeste	80	ag/ag	2/2	15/16	1	#19	South American 3
CK23	PR	Laranjal	80	cr	1/2	s	1	#19	South American 4
CK25	PR	Laranjal	640	-	-	-	0	-	-
CK27	PR	Laranjal	640	cr	1/2	s	1	#14	South American 2

CK31	PR	Laranjal	20	-	-	-	0	-	-
CK35	PR	Cantagalo	20	-	-	-	0	-	-
CK38	PR	Inácio Martins	2560	ag/ag	2/2	21/26	1	#14	South American 2
CK40	PR	Inácio Martins	2560	ag/ag	2/2	30/s	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK41	PR	Inácio Martins	640	-	-	-	0	-	-
CK44	PR	Inácio Martins	1280	ag	1/2	s	1	Novo2	Não-arquétipo
CK48	PR	Inácio Martins	160	ag/cr	2/2	16/s	1	#173	Não-arquétipo
CK49	PR	Inácio Martins	640	ag/cr	2/2	15/s	1	#246	Não-arquétipo
CK50	PR	Inácio Martins	1280	ag/ag	2/2	15/19	1	#246	Não-arquétipo
CK51	PR	Inácio Martins	160	ag/cr	2/2	20/s	1	#19	South American 4
CK52	PR	Inácio Martins	640	ag/ag	2/2	17/19	1	#246	Não-arquétipo
CK53	PR	Imbituva	2560	-	-	-	0	-	-
CK54	PR	Imbituva	640	-	-	-	0	-	-
CK55	PR	Imbituva	2560	ag/ag	2/2	17/19	1	Novo3	Não-arquétipo
CK56	PR	Imbituva	1280	ag/ag	2/2	16/18	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK58	PR	Imbituva	80	ag/ag	2/2	21/22	1	#162	South American 4
CK60	PR	Imbituva	40	-	-	-	0	-	-
CK61	PR	Imbituva	80	-	-	-	0	-	-
CK62	PR	Imbituva	2560	ag/ag	2/2	22/22	1	#162	South American 4
CK63	PR	Ivaí	80	-	-	-	0	-	-
CK64	PR	Ivaí	160	-	-	-	0	-	-
CK65	PR	Ivaí	5120	ag/ag	2/2	21/22	1	#162	South American 4
CK66	PR	Ivaí	640	cr	1/2	s	1	#162	South American 4
CK67	PR	Ivaí	5120	ag/cr	2/2	18/s	1	#162	South American 4
CK73	PR	Ivaí	2560	-	-	-	0	-	-

CK74	PR	Ivaí	160	-	-	-	0	-	-
CK75	PR	Ivaí	320	-	-	-	0	-	-
CK78	PR	Ipiranga	2560	-	-	-	0	-	-
CK79	PR	Ipiranga	80	-	-	-	0	-	-
CK80	PR	Ipiranga	40	-	-	-	0	-	-
CK81	PR	Ipiranga	80	-	-	-	0	-	-
CK82	PR	Ipiranga	40	-	-	-	0	-	-
CK83	PR	Ipiranga	320	ag/ag	2/2	15/16	1	#19	South American 4
CK84	PR	Ipiranga	40	ag/ag	2/2	16/19	1	#278	Não-arquétipo
CK85	PR	Ipiranga	160	ag/cr	2/2	18/s	1	#19	South American 4
CK87	PR	Tibagi	10240	ag/ag	2/2	17/17	1	#162	South American 4
CK96	PR	Imbaú	640	ag/ag/ag	3/3	18/19/22	1	#21	Não-arquétipo
CK100	PR	Tibagi	2560	ag/ag/ag	3/3	16/19/19	1	Novo4	Não-arquétipo
CK102	PR	Tibagi	1280	ag/ag/ag	3/3	19/20/20	1	#206	Não-arquétipo
CK103	PR	Tibagi	160	ag/ag/cr	3/3	22/23/s	1	Novo5	Não-arquétipo
CK104	PR	Cerro Azul	80	-	-	-	0	-	-
CK105	PR	Cerro Azul	10240	ag/cr	2/2	17/s	1	#162	South American 4
CK106	PR	Cerro Azul	2560	ag/ag	2/2	29/30	1	#175	Não-arquétipo
CK109	PR	Cerro Azul	1280	ag/ag	2/2	19/s	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK110	PR	Cerro Azul	80	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK111	PR	Cerro Azul	80	cr	2/2	24/s	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK112	PR	Cerro Azul	40	ag/ag	2/2	11/25	1	Tipo BrI #6	Não-arquétipo
CK113	PR	Cerro Azul	40	-	-	-	0	-	-
CK114	PR	Itaperuçu	20	-	-	-	0	-	-
CK115	PR	Itaperuçu	320	cr	1/2	25	1	#162	Não-arquétipo
CK118	PR	Itaperuçu	320	ag	1/2	20	1	#162	South American 4

CK119	PR	Itaperuçu	1280	ag	1/2	17	1	Novo6	South American 4
CK120	PR	Itaperuçu	320	ag/ag	2/2	17/17	1	Novo6	South American 4
CK121	PR	Itaperuçu	2560	ag/ag	2/2	12/14	1	Novo6	South American 4
CK127	PR	Bocaiúva do Sul	5120	-	-	-	0	-	-
CK133	PR	Guaraqueçaba	160	ag/ag	2/2	10/12	1	Tipo BrI #6	Africa I
CK135	PR	Guaraqueçaba	160	ag/ag	2/2	13/15	1	#14	Não-arquétipo
CK136	PR	Guaraqueçaba	2560	ag/cr	2/2	27/s	1	#19	South American 4
CK137	PR	Guaraqueçaba	320	ag/ag	2/2	10/11	1	Novo7	Não-arquétipo
CK148	PR	Guaraqueçaba	1280	ag/ag	2/2	18/19	1	#162	South American 4
CK150	PR	Guaraqueçaba	80	ag/ag	2/2	16/16	1	#162	South American 4
CK151	PR	Guaraqueçaba	20	ag/cr	2/2	15/s	1	#162	South American 4
CK154	PR	Guaraqueçaba	20	ag/ag	2/2	14/16	1	#162	South American 4
CK157	PR	Antonina	1280				0	-	-
CK159	PR	Antonina	1280	-	-	-	0	-	-
CK166	PR	Antonina	20	ag/ag	2/2	17/18	1	Novo8	Não-arquétipo
CK172	PR	Tijucas do Sul	1280	ag	1/2	18	1	#162	South American 4
CK184	PR	Agudos do Sul	640	ag/ag	2/2	12/13	1	#206	Não-arquétipo
CK185	PR	Agudos do Sul	640	ag/ag	2/2	16/16	1	#53	Não-arquétipo
CK186	PR	Agudos do Sul	320	cr/cr	2/2	25/s	1	#163	Não-arquétipo
CK187	PR	Agudos do Sul	160	ag/ag	2/2	13/15	1	#53	Não-arquétipo
CK188	PR	Agudos do Sul	2560	ag/ag	2/2	12/13	1	#53	Não-arquétipo
CK189	PR	Mandirituba	80	ag	1/2	26	1	#162	South American 4
CK190	PR	Mandirituba	80	-	-	-	0	-	-

CK195	PR	Mandirituba	160	ag/ag	2/2	25/28	1	#162	South American 4
CK196	PR	Tijucas do Sul	80	ag/ag	2/2	18/29	1	#19	South American 4
CK197	PR	Tijucas do Sul	640	ag/ag	2/2	18/s	1	Tipo BrII #11	South American 1
CK198	PR	Tijucas do Sul	320	ag/cr	2/2	18/s	1	#53	Não-arquétipo
CK199	PR	Tijucas do Sul	40	ag/cr	2/2	20/s	1	#162	South American 4
CK200	PR	Tijucas do Sul	640	-	-	-	0	-	-
CK202	PR	Mandirituba	10240	ag/ag	2/2	16/18	1	#162	South American 4
CK204	PR	Mandirituba	160	ag/ag	2/2	14/17	1	#19	South American 4
CK205	PR	Mandirituba	1280	ag/ag/ag	3/3	16/16/18	1	#162	South American 4
CK213	SC	Macieira	160	-	-	-	0	-	-
CK214	SC	Macieira	320	-	-	-	0	-	-
CK216	SC	Macieira	640	-	-	-	0	-	-
CK217	SC	Macieira	160	-	-	-	0	-	-
CK219	SC	Frei Rogério	160	ag/cr	2/2	28/s	1	#19	South American 4
CK220	SC	Frei Rogério	40	-	-	-	0	-	-
CK222	SC	Frei Rogério	160	-	-	-	0	-	-
CK226	SC	Frei Rogério	640	-	-	-	0	-	-
CK227	SC	Frei Rogério	80	-	-	-	0	-	-
CK228	SC	Santa Cecília	160	-	-	-	0	-	-
CK235	SC	Caxambu do Sul	320	-	-	-	0	-	-
CK238	SC	Caxambu do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK239	SC	Caxambu do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK240	SC	Caxambu do Sul	80	-	-	-	0	-	-

CK242	SC	Caxambu do Sul	320	ag	1/2	25	1	#236	Não-arquétipo
CK244	SC	Bandeirante	320	-	-	-	0	-	-
CK245	SC	Bandeirante	160	-	-	-	0	-	-
CK246	SC	Bandeirante	640	-	-	-	0	-	-
CK247	SC	Bandeirante	160	-	-	-	0	-	-
CK248	SC	Bandeirante	40	-	-	-	0	-	-
CK249	SC	Bandeirante	40	-	-	-	0	-	-
CK250	SC	Bandeirante	640	-	-	-	0	-	-
CK251	SC	Bandeirante	640	-	-	-	0	-	-
CK252	SC	Bandeirante	320	cr/cr	2/2	s/s	1	#116	Não-arquétipo
CK253	SC	Campo Erê	20	-	-	-	0	-	-
CK259	SC	Campo Erê	5120	-	-	-	0	-	-
CK260	SC	Campo Erê	160	cr/cr	2/2	25/s	1	#19	Não-arquétipo
CK262	SC	Campo Erê	40	-	-	-	0	-	-
CK263	PR	C. Dominguos Soares	40	-	-	-	0	-	-
CK265	PR	C. Dominguos Soares	40	-	-	-	0	-	-
CK271	PR	C. Dominguos Soares	160	-	-	-	0	-	-
CK272	PR	C. Dominguos Soares	160	-	-	-	0	-	-
CK274	SC	Irineópolis	640	cr	1/2	s	1	#162	Não-arquétipo
CK275	SC	Irineópolis	320	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK276	SC	Irineópolis	160	-	-	-	0	-	-
CK278	SC	Irineópolis	20	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK280	SC	Irineópolis	1280	cr/cr	2/2	s/s	1	Novo4	Caribbean1
CK285	SC	São Joaquim	1280	-	-	-	0	-	-
CK286	SC	São Joaquim	5120	-	-	-	0	-	-
CK287	SC	São Joaquim	5120	-	-	-	0	-	-

CK288	SC	Santa Cecília	320	ag/cr	2/2	26/29	1	Novo9	Não-arquétipo
CK290	SC	Santa Cecília	80	-	-	-	0	-	-
CK293	SC	São Cristovão	80	-	-	-	0	-	-
CK294	SC	São Cristovão	160	-	-	-	0	-	-
CK295	SC	São Cristovão	640	ag/ag	2/2	22/22	1	#53	Não-arquétipo
CK299	SC	Palmeira	320	-	-	-	0	-	-
CK300	SC	Palmeira	320	cr/cr	2/2	26/s	1	Tipo I	Tipo I
CK301	SC	Palmeira	320	ag/ag	2/2	18/26	1	Tipo I	Não-arquétipo
CK302	SC	Palmeira	320	-	-	-	0	-	-
CK303	SC	São Cristovão	1280	-	-	-	0	-	-
CK305	SC	São Cristovão	80	-	-	-	0	-	-
CK306	SC	Painel	40	-	-	-	0	-	-
CK308	SC	Painel	2560	-	-	-	0	-	-
CK311	SC	Painel	160	-	-	-	0	-	-
CK312	SC	Painel	40	-	-	-	0	-	-
CK313	SC	Painel	1280	-	-	-	0	-	-
CK314	SC	Painel	320	ag/ag	2/2	14/17	1	#278	Não-arquétipo
CK315	SC	Painel	40	ag	1/2	15	1	#278	Não-arquétipo
CK321	SC	São Joaquim	40	ag/cr	2/2	22/s	1	#19	South American 4
CK324	SC	São Joaquim	40	-	-	-	0	-	-
CK325	SC	São Joaquim	640	ag/ag	2/2	18/19	1	#19	South American 4
CK326	SC	São Joaquim	5120	-	-	-	0	-	-
CK328	SC	Bom Jardim	20	-	-	-	0	-	-
CK332	SC	Bom Retiro	80	-	-	-	0	-	-
CK333	SC	Bom Retiro	160	-	-	-	0	-	-
CK334	SC	Bom Retiro	160	-	-	-	0	-	-
CK335	SC	Bom Retiro	1280	-	-	-	0	-	-
CK336	SC	Bom Retiro	160	-	-	-	0	-	-

CK337	SC	Bom Retiro	1280	ag/ag	2/2	17/18	1	#278	Não-arquétipo
CK338	SC	Bom Retiro	40	ag/ag/cr	3/3	13/15/s	1	#278	Não-arquétipo
CK340	SC	Bom Retiro	160	ag/ag	2/2	15/17	1	#17	Não-arquétipo
CK342	SC	Angelina	20	-	-	-	0	-	-
CK344	SC	Leoberto Leal	2560	-	-	-	0	-	-
CK351	SC	Canelinha	1280	ag/ag	2/2	15/27	1	#173	Não-arquétipo
CK356	SC	Canelinha	40	-	-	-	0	-	-
CK370	SC	Leoberto Leal	160	ag/ag	2/2	28/28	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK371	SC	Leoberto Leal	640	-	-	-	0	-	-
CK372	SC	Leoberto Leal	160	ag/ag	2/2	18/21	1	Novo1	Não-arquétipo
CK373	SC	Leoberto Leal	1280	-	-	-	0	-	-
CK374	SC	Marjor Gerciano	160	-	-	-	0	-	-
CK375	SC	Marjor Gerciano	20	-	-	-	0	-	-
CK379	SC	José Boiteux	640	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK380	SC	José Boiteux	640	ag/ag	2/2	28/28	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK381	SC	José Boiteux	320	ag/ag	2/2	27/28	1	Tipo I	Tipo I
CK385	SC	Alfredo Wagner	320	ag/ag	2/2	17/17	1	#173	Não-arquétipo
CK386	SC	Alfredo Wagner	160	-	-	-	0	-	-
CK387	SC	Alfredo Wagner	640	ag/ag	2/2	16/23	1	#173	Não-arquétipo
CK388	SC	Alfredo Wagner	160	cr/cr	2/2	s/s	1	#26	Não-arquétipo
CK390	SC	Alfredo Wagner	160	ag/ag	2/2	17/28	1	#173	Não-arquétipo
CK392	SC	Alfredo Wagner	160	-	-	-	0	-	-
CK393	SC	Alfredo Wagner	80	cr/cr	2/2	s/s	1	#163	Não-arquétipo
CK394	SC	José Boiteux	5120	ag	1/2	28	1	Novo10	Não-arquétipo

CK395	SC	José Boiteux	2560	ag/ag	2/2	25/26	1	Novo10	Não-arquétipo
CK396	SC	José Boiteux	320	ag/ag	2/2	20/22	1	Novo10	Não-arquétipo
CK397	SC	José Boiteux	1280	ag/ag	2/2	20/22	1	Novo10	Não-arquétipo
CK398	SC	José Boiteux	640	ag/ag	2/2	20/22	1	Novo10	Não-arquétipo
CK403	SC	Victor Meireles	640	ag/ag	2/2	14/17	1	#19	South American 4
CK404	SC	Victor Meireles	40	ag/ag	2/2	22/22	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK405	SC	Victor Meireles	640	ag/ag	2/2	16/17	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK406	SC	Victor Meireles	160	ag/ag	2/2	21/22	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK407	SC	Victor Meireles	20	-	-	-	0	-	-
CK411	RS	Esperança do Sul	80	-	-	-	0	-	-
CK412	RS	Esperança do Sul	20	-	-	-	0	-	-
CK417	RS	Esperança do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK418	RS	Pirapó	160	cr/cr	2/2	s/s	1	#116	Não-arquétipo
CK419	RS	Pirapó	2560	-	-	-	0	-	-
CK420	RS	Pirapó	2560	-	-	-	0	-	-
CK422	RS	Pirapó	320	-	-	-	0	-	-
CK424	RS	Pirapó	160	ag/cr	2/2	25/s	1	#19	South American 4
CK425	RS	Pirapó	80	-	-	-	0	-	-
CK428	RS	Maçambará	2560	-	-	-	0	-	-
CK429	RS	Maçambará	20	-	-	-	0	-	-
CK434	RS	Maçambará	20	-	-	-	0	-	-
CK435	RS	Maçambará	320	-	-	-	0	-	-
CK438	RS	Maçambará	80	-	-	-	0	-	-
CK443	RS	Barra do Quaraí	320	cr	1/2	s	1	Novo16	Não-arquétipo
CK450	RS	São Vicente do Sul	160	-	-	-	0	-	-

CK451	RS	São Vicente do Sul	320	-	-	-	0	-	-
CK452	RS	São Vicente do Sul	1280	-	-	-	0	-	-
CK453	RS	São Vicente do Sul	1280	-	-	-	0	-	-
CK454	RS	São Vicente do Sul	640	-	-	-	0	-	-
CK455	RS	São Vicente do Sul	40	-	-	-	0	-	-
CK456	RS	São Vicente do Sul	1280	-	-	-	0	-	-
CK458	RS	São Vicente do Sul	160	ag	1/2	24	1	#163	Não-arquétipo
CK459	RS	São Vicente do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK462	RS	São Vicente do Sul	20	-	-	-	0	-	-
CK463	RS	São Vicente do Sul	80	-	-	-	0	-	-
CK464	RS	São Vicente do Sul	1280	-	-	-	0	-	-
CK469	RS	Rosáro do Sul	1280	cr	1/2	s	1	#19	Não-arquétipo
CK471	RS	Rosáro do Sul	1280	-	-	-	0	-	-
CK473	RS	Rosáro do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK480	RS	Aceguá	80	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK482	RS	Aceguá	40	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK483	RS	Aceguá	80	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK486	RS	Herval	5120	cr/cr	2/2	s/s	1	#271	Não-arquétipo
CK490	RS	Herval	40960	ag/ag	2/2	15/17	1	Novo11	Não-arquétipo
CK491	RS	Herval	1280	ag/ag	2/2	18/18	1	Novo11	Não-arquétipo
CK493	RS	Herval	160	cr	1/2	s	1	-	-
CK494	RS	Herval	40	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo II variante	Tipo II
CK497	RS	Maquiné	1280	-	-	-	0	-	-

CK499	RS	Maquiné	80	ag	1/2	17	1	#278	Não-arquétipo
CK507	RS	São José dos Ausentes	1280	-	-	-	0	-	-
CK508	RS	São José dos Ausentes	640	ag	1/2	19	1	Novo12	Não-arquétipo
CK509	RS	São José dos Ausentes	640	-	-	-	0	-	-
CK510	RS	São José dos Ausentes	640	ag	1/2	20	1	Novo12	Não-arquétipo
CK511	RS	São José dos Ausentes	20	-	-	-	0	-	-
CK514	RS	Monte Alegre do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK516	RS	Monte Alegre do Sul	160	-	-	-	0	-	-
CK517	RS	Monte Alegre do Sul	2560	ag	1/2	21	1	#17	Não-arquétipo
CK519	RS	Monte Alegre do Sul	5120	cr/cr	2/2	s/s	1	#17	Não-arquétipo
CK521	RS	Monte Alegre do Sul	1280	cr	1/2	s	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK522	RS	Monte Alegre do Sul	160	cr	1/2	s	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK526	RS	Capão Bonito do Sul	80	-	-	-	0	-	-
CK528	RS	Capão Bonito do Sul	320	-	-	-	0	-	-
CK531	RS	Capão Bonito do Sul	2560	ag/cr	2/2	24/s	1	#21	Não-arquétipo
CK532	RS	Capão Bonito do Sul	320	-	-	-	0	-	-
CK533	RS	Capão Bonito do Sul	160	ag/ag	2/2	17/18	1	Novo11	Não-arquétipo
CK534	RS	Capão Bonito do Sul	320	cr	1/2	29	1	#21	Não-arquétipo
CK535	RS	Machadinho	2560	cr	1/2	s	1	Tipo I	Tipo I
CK539	RS	Machadinho	80	-	-	-	0	-	-

CK542	RS	Machadinho	160	ag/cr	2/2	30/s	1	Novo13	Não-arquétipo
CK543	RS	Machadinho	80	-	-	-	0	-	-
CK544	RS	Machadinho	160	cr/ag	2/2	17/s	1	Novo13	Não-arquétipo
CK545	RS	Quatro Irmãos	2560	cr/cr	2/2	s/s	1	#116	Não-arquétipo
CK546	RS	Quatro Irmãos	160	-	-	-	0	-	-
CK547	RS	Quatro Irmãos	40	-	-	-	0	-	-
CK548	RS	Quatro Irmãos	160	-	-	-	0	-	-
CK549	RS	Quatro Irmãos	40	-	-	-	0	-	-
CK550	RS	Ibirapuitã	2560	cr	1/2	s	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK551	RS	Ibirapuitã	320	-	-	-	0	-	-
CK552	RS	Ibirapuitã	80	-	-	-	0	-	-
CK553	RS	Ibirapuitã	160	-	-	-	0	-	-
CK554	RS	Ibirapuitã	640	-	-	-	0	-	-
CK555	RS	Ibirapuitã	80	-	-	-	0	-	-
CK556	RS	Ibirapuitã	40	cr	1/2	s	1	Tipo III	Tipo III
CK557	RS	Ibirapuitã	640	cr/cr	2/2	s/s	1	#163	Não-arquétipo
CK558	RS	Ibirapuitã	5120	cr/cr	2/2	s/s	1	#135	Não-arquétipo
CK559	RS	Ibirapuitã	80	-	-	-	0	-	-
CK560	RS	Barros Cassal	640	cr/cr	2/2	26/s	1	Novo14	Não-arquétipo
CK561	RS	Barros Cassal	20	-	-	-	0	-	-
CK566	RS	Barros Cassal	80	cr	1/2	s	1	#87	Não-arquétipo
CK569	RS	Barros Cassal	160	-	-	-	0	-	-
CK570	RS	Vale Verde	80	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Não-arquétipo
CK573	RS	Vale Verde	640	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo
CK575	RS	Vale Verde	320	cr/cr	2/2	s/s	1	#19	South American 4
CK576	RS	Vale Verde	320	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK577	RS	Vale Verde	320	-	-	-	0	-	-
CK578	RS	Vale Verde	640	-	-	-	0	-	-

CK579	RS	Vale Verde	640	ag/cr	2/2	19/s	1	#19	South American 4
CK580	RS	Dom Feliciano	80	-	-	-	0	-	-
CK581	RS	Dom Feliciano	320	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK582	RS	Dom Feliciano	160	ag/ag	2/2	12/14	1	Novo15	Não-arquétipo
CK584	RS	Dom Feliciano	1280	cr/cr	2/2	s/s	1	Tipo III	Tipo III
CK588	RS	Dom Feliciano	160	cr/cr	2/2	s/s	1	Novo15	Não-arquétipo
CK589	RS	Dom Feliciano	20	-	-	-	0	-	-
CK591	RS	São Lourenço do Sul	1280	ag/ag	2/2	18/18	1	#19	Não-arquétipo
CK592	RS	São Lourenço do Sul	640	ag/ag	2/2	14/15	1	#19	Não-arquétipo
CK593	RS	São Lourenço do Sul	640	ag	1/2	21	1	#19	Não-arquétipo
CK594	RS	São Lourenço do Sul	20	ag	1/2	9	1	-	-
CK595	RS	São Lourenço do Sul	320	cr/cr	2/2	s/s	1	Novo17	Tipo III
CK596	RS	São Lourenço do Sul	1280	ag/cr	2/2	19/27	1	Tipo BrII #11	South American 1
CK597	RS	São Lourenço do Sul	20	ag/ag	2/2	26/26	1	#116	Não-arquétipo
CK598	RS	São Lourenço do Sul	160	ag/ag	2/2	11/14	1	Novo17	Tipo III
CK599	RS	São Lourenço do Sul	320	ag/ag	2/2	14/19	1	#116	Não-arquétipo
CK601	RS	Capão do Leão	20	-	-	-	0	-	-
CK602	RS	Capão do Leão	160	ag/ag	2/2	18/21	1	Tipo BrIII #08	Não-arquétipo

[&] 0: resultado negativo; 1: resultado positivo.
* Título ≥ 20 no Teste de Aglutinação Modificado (MAT).
[#] Agudo (Ag): foram encontrados taquizoítas no pulmão do camundongo; Crônico (Cr): foram observados apenas cistos no cérebro.
¥ Sobrevida 300 dias pós-inoculação;