

Scrapie em ovinos: etiologia e diagnóstico *in vivo*

Cristina Santos Sotomaioir
Fernanda Trentini Lopes Ribeiro
Rüdiger Daniel Ollhoff

RESUMO

Scrapie é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET), ou doenças priônicas, que inclui a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB). O acúmulo de uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) da proteína priônica celular (PrP^C) do hospedeiro no tecido nervoso e linforreticular é a causa do *scrapie*. Os principais sinais clínicos são: prurido, alterações no comportamento, incoordenação motora, ataxia e perda progressiva de peso. *Scrapie*, assim como outras doenças priônicas, possui um impacto considerável na saúde e bem-estar animal e apresenta-se como uma doença ainda pouco compreendida nos rebanhos ovinos brasileiros. O diagnóstico é baseado na demonstração da PrP^{Sc} no cérebro ou, no animal vivo, no tecido linfoide periférico. Como o acúmulo da PrP^{Sc} no tecido linfoide é anterior ao acúmulo no sistema nervoso central, biópsias de tecidos linfoides como tonsila, terceira pálpebra e tecido linfoide associado à mucosa reto-anal, seguida de imunocoloração para PrP, possibilitam o diagnóstico pré-clínico do *scrapie*. Esta revisão ressalta os novos métodos de diagnóstico *in vivo*, delineando seu potencial para uso em programas de controle do *scrapie*.

Palavras-chave: Biópsia retal. Imunohistoquímica. Proteína prion celular.

Scrapie: Etiology and diagnosis in live sheep

ABSTRACT

Scrapie is a fatal, neurodegenerative disease that affects sheep and goats and belongs to the Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) or prion diseases, which include Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in cattle. It is caused by the deposition of an abnormal isoform (PrP^{Sc}) of the host-encoded cellular prion protein (PrP^C) in the central nervous system and

Cristina Santos Sotomaioir é Médica Veterinária, Doutora em Processos Biotecnológicos (2007/UFPR), Professora Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* São José dos Pinhais, BR 376 Km 14, São José dos Pinhais, PR 83010-500, Brasil. E-mail: cristina.sotomaioir@pucpr.br

Fernanda Trentini Lopes Ribeiro é Bióloga, Mestre em Ciência Animal (2011/PUCPR), bolsista de mestrado do CNPq. Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* São José dos Pinhais, BR 376 Km 14, São José dos Pinhais, PR 83010-500, Brasil. E-mail: fertrentini@bol.com.br

Rüdiger Daniel Ollhoff é Médico Veterinário, Doutor em Microbiologia Clínica (1996/Tierärztliche Hochschule Hannover), Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* São José dos Pinhais, BR 376 Km 14, São José dos Pinhais, PR 83010-500, Brasil. E-mail: ollhoff@gmail.com.

Endereço para correspondência: Cristina Santos Sotomaioir – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), *Campus* São José dos Pinhais, BR 376 Km 14, São José dos Pinhais, PR 83010-500, Brasil. E-mail: cristina.sotomaioir@pucpr.br

Veterinária em Foco	Canoas	v.9	n.2	p.143-157	jan./jun. 2012
---------------------	--------	-----	-----	-----------	----------------

lymphoreticular system. Characteristic clinical signs of the disease are behavioural disturbances, pruritus and increased difficulty in locomotion. Scrapie, as other prion diseases, has considerable impact on animal health and welfare and is not completely understood in Brazilian sheep flocks. Scrapie diagnosis is based on the demonstration of disease-associated prion protein (PrP^{Sc}) in brain or, in the live animal, in readily accessible peripheral lymphoid tissue. PrP^{Sc} accumulations are detectable in the lymphoid tissues of scrapie infected sheep before they can be detected in the central nervous system. So demonstration of PrP^{Sc} in tissues of the lymphoreticular system can be used to detect preclinical cases of scrapie. Biopsy of accessible lymphoid tissue such as tonsil, third eyelid or recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue (RAMALT) followed by immunostaining for PrP offers the possibility of detection of incubated scrapie cases. This review emphasizes new methods of diagnosis *in vivo*, outlining their potential for use in scrapie control programs.

Keywords: Cellular prion protein. Immunohistochemistry. Rectal biopsy.

INTRODUÇÃO

Scrapie é uma doença neurológica fatal que acomete ovinos e caprinos. É uma enfermidade da lista da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), portanto de notificação obrigatória. Faz parte de um grupo heterogêneo de doenças priônicas ou Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET), que inclui Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Doença Crônica de Cervídeos e Encefalopatia Transmissível de Mink (PRUSINER, 1998). As EETs são doenças neurodegenerativas, com longos períodos de incubação, (PRUSINER, 2004a), que se caracterizam pela deposição da isoforma anormal da proteína priônica (PrP) celular do hospedeiro em vários tipos de células, especialmente no sistema nervoso central (SNC) e tecido linforreticular (baço, tonsilas e linfonodos) (BÜELER et al., 1993; PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999; ANDRÉOLETTI et al., 2000).

Scrapie também é denominada como Paraplexia Enzoótica dos Ovinos e Tremor Enzoótico Ovino. O termo *scrapie* vem da palavra inglesa *scrape*, que tem o significado de raspar, arranhar ou esfolar. O *scrapie* foi a primeira das EETs a ser descrita e comprovada, com o primeiro registro em 1732 na Grã Bretanha (McGOWAN, 1922 apud DETWILER; BAYLIS, 2003); apesar disto, muitos aspectos do *scrapie* ainda permanecem parcialmente ou totalmente desconhecidos (DAWSON et al., 2008).

É considerada uma doença endêmica em vários países da Europa, no Canadá e nos Estados Unidos, sendo relatada em diversos países do mundo. Poucos países, como Austrália e Nova Zelândia, são consideradas livres da ocorrência desta enfermidade (DETWILER; BAYLIS, 2003; DAWSON et al., 2008; HARRINGTON et al., 2010). No Brasil, o primeiro relato de *scrapie* ocorreu em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (FERNANDES et al., 1978). Desde então, há várias notificações na Organização Mundial da Saúde Animal – OIE (www.oie.int) e também casos relatados na literatura (RIBEIRO, 1996; RIBEIRO; RODRIGUES, 2001; RIBEIRO et al., 2007). O caso ocorrido em 2003 no Paraná foi considerado o primeiro caso autóctone do Brasil (POHL DE SOUZA et al., 2005).

Apesar do *scrapie* não ser transmissível para o homem, a possibilidade da EEB estar circulando nas populações de pequenos ruminantes (FOSTER et al., 1993, 1996; ELOIT et al., 2005) tornou esta EET dos ovinos e caprinos uma preocupação de segurança alimentar e saúde pública (ELOIT et al., 2005). Historicamente, o *scrapie* clássico provou ser uma doença de difícil controle. O longo período de incubação, que pode durar anos, e a má compreensão da etiologia, patogenia e epidemiologia limitam as opções de controle (DAWSON et al., 2008).

Polimorfismos nos códons 136 (alanina, A/ valina, V), 154 (histidina, H/ arginina, R) e 171 (histidina, H/ glutamina, Q/ arginina, R) do gene da proteína prion celular (PRNP) são capazes de indicar ou refletir as variações na susceptibilidade (GOLDMANN et al. 1990; BELT et al., 1995; HUNTER et al., 1997a,b). Entre as possíveis combinações dos aminoácidos nestes três principais códons, apenas cinco (ARR, ARQ, ARH, AHQ, VRQ) são normalmente encontrados em ovinos, cujos pareamentos em homo ou heterozigose geram 15 genótipos possíveis (BELT et al., 1995; DAWSON et al., 1998). O genótipo ARR/ARR, apesar de casos comprovados de animais ARR/ARR infectados (GROSCHUP et al., 2007), é considerado o mais resistente aos agentes causadores do *scrapie* clássico. O alelo VRQ está associado à alta susceptibilidade no desenvolvimento da doença (HUNTER et al., 1997a,b; ELSESEN et al., 1999; ACÍN et al., 2004; BILLINIS et al., 2004).

Programas baseados em seleção de animais geneticamente resistentes ao *scrapie* têm conseguido resultados relevantes na diminuição de animais clinicamente afetados (DOESCHL-WILSON et al., 2009; ORTIZ-PELAEZ; BIANCHINI, 2011).

O objetivo desta revisão é abordar aspectos etiológicos e de diagnóstico, enfatizando os novos métodos de diagnóstico *in vivo*, delineando seu potencial para uso em programas de controle do *scrapie*.

PRIONS

Prions são proteínas infecciosas e o termo “prion” denomina o agente infeccioso de uma série de doenças, caracterizadas por neurodegeneração espongiiforme e proliferação de células da glia (PRUSINER, 2004b). Prusiner em 1982 estabeleceu que uma macromolécula específica, ou seja uma proteína, era necessária para criar um fator infeccioso; a partir daí criou o termo prion (dos termos em inglês: **proteinaceous** e **infectious**), para descrever as moléculas pequenas do processo infeccioso.

Bolton et al. (1982), trabalhando com cérebro de hamster infectado com *scrapie*, identificaram uma proteína com massa molecular variando de 27 a 30 kDa. Esta proteína apresentou resistência a tratamento com proteinase K (PK) e foi detectada em cérebro de animais infectados após digestão com esta enzima, não sendo detectada em cérebro de animais sadios submetido ao mesmo tratamento. Sob ação da proteinase K, 67 aminoácidos da região N-terminal da proteína são degradados resultando na molécula que ficou conhecida como PrP 27-30, devido a variação de sua massa

molecular, e que corresponde à porção da proteína prion *scrapie* que é resistente a PK e capaz de manter infectividade (PRUSINER, 1998, 2004c; THACKRAY et al., 2007).

Prusiner (1982) propôs um modelo de infecção que descreve a capacidade da forma “*scrapie*” da proteína em induzir a modificação da proteína prion celular normal por “mímica”. Mais tarde, o gene para esta proteína foi identificado e sua sequência não apresentou nenhuma diferença entre animais infectados e sadios (BASLER et al., 1986). Esses dados mostram que a proteína priônica causadora do *scrapie* é codificada no genoma do próprio hospedeiro independentemente da doença e, portanto, indicam que eventos pós-traducionais seriam responsáveis pelas diferenças entre a isoforma celular e a isoforma relacionada à doença (CAUGHEY et al., 1991; BÜELER et al., 1993; HORIUCHI; CAUGHEY, 1999).

Segundo McKintosh et al. (2003), considerando as ETT de modo geral, sabe-se que a proteína modificada pode ter vários mecanismos de origem: infecciosos, hereditários ou espontâneos. No caso do *scrapie* clássico, para o animal se infectar, há a necessidade da infecção via oral pela proteína alterada (mecanismo infeccioso), ainda que os diferentes genótipos do animal possam interferir na velocidade da conversão da proteína inalterada (PrP^C) para a proteína alterada infectante (PrP^{Sc}) (STEVENS et al., 2009). No entanto, em casos de *scrapie* atípico (BENESTAD et al., 2003), especula-se que este poderia ser resultado de mecanismos espontâneos, como ocorre na Doença de Creutzfeldt-Jakob Esporádica em humanos (NÖREMARK, 2006).

A PrP^C é uma proteína com cerca de 250 aminoácidos (dependendo da espécie), expressa por um gene cromossômico de cópia única, localizado no cromossomo 13, apresentando uma homologia de sequência de 80 a 90% nas distintas espécies de mamíferos (LEE et al. 1998). A PrP^C localiza-se na superfície da célula ancorada a um sistema denominado GPI (localizado na porção C-terminal glicofosfatidilinositol) e presente em todos os animais (HUNTER, 1997). Apesar de muitos estudos descritos, a função celular da PrP^C ainda não é totalmente conhecida (PRCINA; KONTSEKOVA, 2011).

O acúmulo anormal da proteína em tecidos linfoides e sistema nervoso acontece devido à transformação conformacional da alfa-hélice, presente em grande quantidade na isoforma normal (PrP^C) para beta-folha, presente em grande quantidade na isoforma atípica (PrP^{Sc}), insolúvel e particularmente resistente (CAUGHEY et al., 1991; SORBY et al., 2009). A mudança conformacional entre PrP^C e PrP^{Sc} reflete em diferentes respostas físico-químicas. Enquanto PrP^C responde de forma lábil, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a PrP^{Sc} apresenta uma resposta lenta e se torna propensa a formação de agregados, conhecidos como amiloide (PRUSINER, 1998, 2004c), e apresenta também resistência aos mais severos tratamentos químicos (MASTRANGELO; WESTAWAY, 2001). Além disso, PrP^{Sc} é insolúvel em detergentes e se acumula, ao contrário de PrP^C que é reciclada rapidamente (CAUGHEY et al., 1991; MASTRANGELO; WESTAWAY, 2001).

TRANSMISSÃO, PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A transmissão do *scrapie* acontece de forma natural, porém o modo de transmissão da doença ainda não é totalmente conhecido (RYDER et al., 2004; DAWSON et al., 2008). O meio mais comum pelo qual o *scrapie* é introduzido num rebanho livre da doença é através da introdução de animais infectados e que estejam na fase de incubação (HOINVILLE, 1996). Em condições naturais, a infecção pelo agente do *scrapie* acontece pela via oral (DETWILER; BAYLIS, 2003).

A principal fonte de contaminação do ambiente por tecidos infectivos é a placenta e os fluidos fetais, levando a um aumento na transmissão do *scrapie* durante a estação de nascimentos (ANDRÉOLETTI et al., 2002; TOUZEAU et al., 2006). Fluidos corporais como fezes, urina, sêmen e saliva são considerados como não contagiosos (DETWILER; BAYLIS, 2003). Trabalhos relatam presença do prion no sangue (CASTILLA et al., 2005; HOUSTON et al., 2008) e leite (LIGIOS et al., 2005; FRANSCINI et al., 2006; KONOLD et al., 2008).

A disseminação da doença inicia-se logo após a infecção direta do animal com o prion. A PrP^{Sc} se acumula e torna-se detectável nas placas de Peyer, onde a infecção provavelmente ocorre. A partir daí, a PrP^{Sc} se espalha progressivamente nos tecidos e estruturas linfoides secundárias replicando-se e chegando ao Sistema Nervoso Entérico (SNE). O Sistema Nervoso Central (SNC) é invadido, a partir deste ponto, via tratos nervosos autônomos (ANDRÉOLETTI et al., 2006). Ainda que os mecanismos de infecção do *scrapie* não sejam totalmente entendidos, a deposição da PrP^{Sc} nos tecidos está diretamente relacionada ao processo infeccioso das ETT e é o principal marcador molecular para este grupo (ANDRÉOLETTI et al., 2000).

Este esquema de infecção é o observado em ovinos com os genótipos mais susceptíveis. Entretanto, não correlaciona com dados obtidos em ovinos naturalmente afetados e heterozigotos para o alelo ARR (VAN KEULEN et al., 1996); em alguns animais ARQ/VRQ (JEFFREY et al., 2000) ou na EEB bovina (WELLS; WILESMITH, 2004). Em todos estes casos, nenhuma (ou quantidades muito pequenas) da PrP^{Sc} é detectada no tecido linfoide.

Nos ovinos, a doença clínica se manifesta como uma desordem não febril, crônica, progressiva, neurodegenerativa e fatal. Os principais sinais clínicos que são relatados estão associados a uma irritação na pele, mudanças de comportamento, na postura e movimentação e perda de peso, mesmo que o animal continue se alimentando. Os sinais clínicos podem variar e alguns animais não apresentam um quadro típico (COCKCROFT; CLARK, 2006; OLLHOFF; SOTOMAIOR, 2011). Os relatos podem ser diferentes de acordo com o país onde se realizou a observação (VARGAS et al. 2005) e a acuidade da investigação, porém alguns sinais são constantemente relatados, tais como o prurido. Outros sinais podem incluir: déficit propioceptivo, bruxismo, tetraparesia, perda do reflexo de ameaça, nistagmos, vômitos, disфонia e timpanismo ruminal (TYLER; MIDDLETON, 2004; COCKCROFT; CLARK, 2006).

A duração dos sinais clínicos é muito variável, podendo ser de duas semanas a seis meses. Períodos de stress podem coincidir com o início dos sinais clínicos, ou exacerbar a severidade dos mesmos (COCKCROFT; CLARK, 2006). Estudos realizados por Foster e Dickinson (1989) indicam que a idade na qual o ovino infectado morre com sintomatologia de *scrapie* depende fundamentalmente da idade na qual foi primeiro exposto e da dose infectante.

O período de incubação é também bastante variável, de um a quatro anos experimentalmente (HUNTER, 1997) e de um a sete anos a campo (ESPINOSA et al., 2004). Atualmente, reconhece-se que este período de incubação está diretamente relacionado ao genótipo do animal acometido, podendo variar de 174 dias para os animais VRQ/VRQ a 2150 dias em animais ARR/AHQ (HUNTER, 2006).

DIAGNÓSTICO

A detecção de PrP^{Sc} é o método mais específico para o diagnóstico da doença em qualquer animal (PRUSINER et al., 2004). PrP^{Sc} somente é encontrada nas doenças priônicas e, assim, a sua presença em ovinos e caprinos é diagnóstica da infecção priônica. No Brasil, segundo a Instrução Normativa nº 15 de 2008 (BRASIL, 2008) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), são considerados animais com diagnóstico para *scrapie* os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de imunohistoquímica (IHQ) em amostras de tecido nervoso ou linfóide.

O diagnóstico diferencial do *scrapie* deve ser feito com doenças que apresentam sinais neurológicos, prurido, ataxia, hiperestesia e emagrecimento (COCKCROFT; CLARK, 2006). Entre as principais, pode-se destacar: pneumonia progressiva ovina, listeriose, pseudo-raiva, raiva, ectoparasitos, toxinas, toxemia da gestação, polencefalomalácia, envenenamento por chumbo, migrações parasitárias no SNC, abscessos cerebrais, Maedi-visna e deficiência de vitamina A (ESPINOSA et al., 2004).

O diagnóstico das EET foi inicialmente feito a partir da descoberta de mudanças espongiiformes e da deposição de amino-plaquetas no exame histológico. A histopatologia, no entanto, pode ser bastante variável, com vacuolização da neurópila e astrogliose reativa variando consideravelmente na intensidade e localização. Segundo Jeffrey (2006), as lesões histológicas de *scrapie* continuam a ser descritas como vacuolização, astrocitose e perda neuronal, apesar de nenhuma das três estar sempre presente nos casos clínicos de *scrapie* e que a perda neuronal seja raramente observada histologicamente. As alterações espongiiformes da neurópila são comumente encontradas no *scrapie* clássico, mas a distribuição neuroanatômica da vacuolização na substância cinzenta e a proporção da vacuolização da neurópila e intraneuronal podem variar. Alguns casos clínicos de *scrapie* podem demonstrar poucas evidências de vacuolização e, em algumas situações, não se detecta vacuolização no cérebro de animais clinicamente afetados (ERSDAL et al., 2003). Segundo Gavier-Widén et al. (2005), o diagnóstico baseado somente nos achados histopatológicos é possível quando há a presença característica dos vacúolos no encéfalo, com distribuição neuroanatômica típica.

O teste mais específico para as EETs disponível até o momento é o reconhecimento da presença de imunomarcagem específica da doença nas áreas alvo e com os padrões característicos (GAVIER-WIDÉN et al. 2005). A detecção da doença associada com acúmulo de proteína priônica pode ser feita pelas técnicas de imunoblotting e imunohistoquímica (GONZÁLEZ et al., 2003). A produção de anticorpos tem permitido que a análise imunohistoquímica promova especificidade no diagnóstico, em especial nos casos onde placas não são prolíficas ou onde há dúvida sobre a causa das mudanças espongiiformes (McKINTOSH et al., 2003). Há também evidências de que o acúmulo de PrP^{Sc} no tecido nervoso é prévio à neurodegeneração espongiiforme (DeARMOND; PRUSINER, 1993; JEFFREY et al., 2001), o que permite que estes métodos possam diagnosticar as ETT antes do aparecimento de sinais clínicos e também nos casos em que as lesões neuropatológicas são mínimas ou ausentes. Ambos os métodos podem ser utilizados para identificar PrP anormal nos tecidos linfoides, no trato alimentar e nos sistemas nervoso periférico e autônomo. O grau em que tecidos periféricos estão envolvidos no *scrapie* clássico depende da dose e cepa infectante e do genótipo do animal (JEFFREY, 2006).

A análise imunohistoquímica normalmente é realizada a partir de material conservado em formol e envolve o uso de pré-tratamento das secções histológicas com ácido fórmico e autoclavagem para a exposição dos epítomos e remoção da PrP^C normal (VAN KEULEN et al. 1995). Alguns protocolos incluem também a digestão proteolítica. Diferentes anticorpos monoclonais e policlonais anti-PrP podem ser usados e um número crescente estão agora disponíveis no mercado, variando apenas a eficiência de cada um dependendo da espécie utilizada. Alguns têm melhor desempenho em uma determinada espécie, e outros são espécie-específicos (GAVIER-WIDÉN et al. 2005). Estes anticorpos não são necessariamente capazes de distinguir entre as duas isoformas de PrP. Portanto, previamente à detecção de PrP^{Sc} é necessário degradar a PrP^C, geralmente com proteinase K (PK). Estão sendo desenvolvidos alguns anticorpos que detectam epítomos específicos da PrP^{Sc} (ZOU et al., 2004), possível pela alteração conformacional da proteína no momento de conversão da isoforma PrP^C para a PrP^{Sc}, expondo epítomos que na forma normal (celular) permanecem ocultos (PARAMITHIOTIS et al., 2003). Porém, até agora nenhum destes anticorpos provou ser realmente adequado para a identificação direta da PrP^{Sc} pela IHQ, e sua aplicação em outros testes ainda precisa ser estudada (GAVIER-WIDÉN et al. 2005).

A técnica de IHQ detecta a PrP^{Sc} *in situ*, permitindo determinar tanto a presença da proteína patológica como sua distribuição no tecido, sua localização celular e as características morfológicas do acúmulo (GONZÁLEZ et al., 2003).

DIAGNÓSTICO *IN VIVO*

Historicamente, Hoinville (1996) responsabilizava a falta de diagnóstico ante mortem de animais infectados pelo prion, como o principal fator de disseminação da doença. Até recentemente, somente diagnósticos post mortem eram possíveis de

serem realizados. Atualmente, o diagnóstico pré-clínico pode ser realizado em ovinos e caprinos (GROSCHUP, 2006). Considera-se possível a realização de diagnóstico pré-clínico a partir de biópsias de terceira pálpebra e tonsilas (VAN KEULEN et al., 1996; O'ROURKE et al., 1998, 2000; JEFFREY et al., 2001).

Entretanto, em casos de ovinos com genótipos menos susceptíveis ao desenvolvimento da doença, há uma menor distribuição da PrP^{Sc} relacionada ao tecido linfático, limitando-se ao tecido linfoide associado ao intestino (KONOLD et al., 2008). Estas limitações do acúmulo da PrP^{Sc}, levaram González et al. (2005, 2006), a pesquisar o potencial diagnóstico do tecido linfoide associado à mucosa reto-anal (RAMALT – do termo em inglês *recto-anal mucosa-associated lymphoid tissue*) quanto ao acúmulo da PrP^{Sc}.

Além disso, segundo González et al. (2008b), o diagnóstico em animais vivos, assintomáticos, baseado em biópsias de tonsila palatina ou terceira pálpebra, são procedimentos pouco práticos de serem realizados a campo, em larga escala, devido a sua difícil metodologia e técnica. A biópsia de amostras da mucosa retal, para obtenção de tecido linfoide associado à mucosa retoanal (GONZÁLEZ et al. 2005; ESPENES et al., 2006), apresenta uma técnica de colheita do material via mucosa retal que causa o mínimo de desconforto para o animal. Pode, entretanto, ocorrer hemorragia caso a colheita seja feita em dois momentos contínuos. Porém, segundo Espenes et al. (2006), quando desenvolvida da forma correta, apresenta caracteres morfológicos bem conservados, exceto artefatos localizados nas “bordas” da amostra. Em animais com diagnóstico positivo por IHQ no SNC ou em outros tecidos linforreticulares, o método apresentou 97,0% de sensibilidade, detectando apenas aqueles animais cuja IHQ era positiva para SNC e não para os outros tecidos linfoides. Em 100% dos casos negativos para os outros órgãos ou tecidos, a IHQ da mucosa retal também foi negativa (GONZÁLEZ et al. 2005). Após certo treinamento, a técnica é rápida e simples de ser feita, não necessitando sedação e podendo ser repetida várias vezes durante a vida do animal (GONZALEZ et al., 2008a,b).

As técnicas de diagnóstico *in vivo* também apresentam limitações. A detecção de PrP^{Sc} no tecido linfoide é eficiente quando a doença se encontra aproximadamente na metade do período de incubação. Estudos apontam que resultados negativos para o tecido linfoide, não garantem que ovinos e caprinos estejam livres da infecção do *scrapie* (SCHREUDER et al., 1996; GONZÁLEZ et al., 2008b). Enquanto que a IHQ de tecidos linfoides pode detectar casos em fase de incubação do *scrapie*, antes da PrP^{Sc} ser detectada no SNC, alguns ovinos que apresentam genótipos menos suscetíveis, mesmo em um estágio clínico mais avançado doença, podem não apresentar acúmulo da PrP^{Sc} no tecido linfoides (VAN KEULEN et al., 1996; MONLEON et al., 2005).

Outra dificuldade das biópsias de tecidos linfoides é o fato de que, em muitos casos, uma quantidade insuficiente de tecido é obtida. A primeira distribuição da PrP^{Sc} no tecido linfoide não é homogênea, portanto, deve-se considerar, segundo Gavier-Widen et al. (2005), um número mínimo de quatro a seis folículos com centro germinal a ser examinado na IHQ para se considerar um diagnóstico confiável.

SCRAPIE ATÍPICO

O *scrapie* atípico/Nor 98 é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET) de pequenos ruminantes (BENESTAD et al., 2003; MOUM et al. 2005). Esta doença foi identificada em 1998 e sua etiologia e epidemiologia é pouco conhecida (BENESTAD et al., 2003; FEDIAEVSKY et al., 2009).

O Nor98 difere claramente do *scrapie* clássico em muitos aspectos e desafia o diagnóstico do *scrapie*. Os casos do Nor98 têm menos PrP^{Sc} PK-resistente no tecido encefálico que os casos de *scrapie* clássico. Essas características poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o porquê de alguns testes rápidos apresentarem problemas em detectar a maioria dos casos de Nor98 (BENESTAD et al., 2006).

Em muitos casos, o *scrapie* atípico não coexiste com o *scrapie* clássico; porém, há relatos de desenvolvimento do prion atípico em rebanhos onde existia previamente a forma clássica da doença. Também são descritos em locais onde há biossegurança ativa e aonde não há qualquer ocorrência anterior de *scrapie* clássico ou atípico (SIMMONS et al., 2010). Na maioria dos casos, a forma atípica é detectada apenas em um ovino por rebanho e no estudo de dois casos-controles ocorridos na Noruega e França nenhum fator de risco, indicando transmissão entre rebanhos, foi detectado (RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2010), o que poderia permitir que fosse considerada espontânea, como ocorre na Doença de Creutzfeldt-Jakob Esporádica em humanos (NÖREMARK, 2006).

Os casos de Nor 98 diferem do *scrapie* clássico e do BSE em diversos fatores, incluindo a distribuição neuroanatômica de lesões histopatológicas e a deposição de PrP^{Sc}. A distinção entre os tipos se baseia nestas características e é confirmada pela observação do perfil eletroforético da Nor 98 no Western blot, caracterizado por uma rápida migração de uma banda de aproximadamente 12 KDa (BENESTAD et al., 2003).

Para o *scrapie* clássico, a coloração de imunohistoquímica e as mudanças histopatológicas no encéfalo, nas regiões do óbex e da medula oblonga e principalmente no núcleo motor dorsal do nervo vago caracterizam a doença, porém no caso de amostras de *scrapie* atípico isso difere. Quando presente, a vacuolização e a coloração de IHQ se apresentam de forma mais acentuada nas regiões do córtex cerebelar e cerebral, caracterizando a região do cerebelo em adição a região do óbex, como pontos cruciais para o diagnóstico de Nor98 (BENESTAD et al., 2006; RODRÍGUEZ-MARTINEZ et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços conquistados com a possibilidade de diagnósticos mais precoces da presença da PrP^{Sc}, associados à possibilidade de direcionamento nos cruzamentos para aumentar a resistência dos animais, tem diminuído a incidência do *scrapie* em alguns países.

No Brasil, ainda que haja poucas notificações de *scrapie*, considera-se que a situação do controle de todas as encefalopatias espongiformes transmissíveis é essencial para a comercialização dos produtos de origem animal, tanto a partir de rebanhos de pequenos ruminantes, quanto de bovinos; para isto, o conhecimento das técnicas de diagnóstico por parte do médico veterinário com atuações no campo e no laboratório é de fundamental interesse para a proteção da saúde de nossos rebanhos.

REFERÊNCIAS

- ACÍN, C. et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *Journal of General Virology*, v.85, p.2103-2110, 2004.
- ANDRÉOLETTI, O. et al. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, v.81, p.3115-3126, 2000.
- ANDRÉOLETTI, O. et al. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*, v.83, p.2607-2616, 2002.
- ANDRÉOLETTI, O. et al. The pathogenesis of scrapie in small ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p.41.
- BASLER, K. et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, v.46, p.417-428, 1986.
- BELT, P. B. G. M. et al. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology*, v.76, p.509-517, 1995.
- BENESTAD, S. L. et al. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record*, v. 153, p. 202-208, 2003.
- BENESTAD, S. L. et al. Atypical scrapie in Norway. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 55.
- BILLINIS, C. et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 547-554, 2004.
- BOLTON, D. C.; MCKINLEY, M. P.; PRUSINER, S. B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, v.218, p.1309-1311, 1982.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 15, de 02 de abril de 2008. *Diário Oficial da União*, de 04 abril 2008.
- BÜELER, H. et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, v.73, p.1339-1347, 1993.
- CASTILLA, J.; SAÁ, P.; SOTO, C. Detection of prions in blood. *Nature Medicine*, v.11, n.9, p.982-985, 2005.
- CAUGHEY, B. W. et al. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, v.30, v.43, p.7672-7680, 1991.

COCKCROFT, P. D.; CLARK, A. M. The Shetland Islands scrapie monitoring and control programme: Analysis of the clinical data collected from 772 scrapie suspects 1985-1997. *Research in Veterinary Science*, v.80, p.33-44, 2006.

DAWSON, M. et al. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record*, v.142, p.623-625, 1998.

DAWSON, M.; MOORE, R. C.; BISHOP, S. C. Progress and limits of PrP gene selection. *Veterinary Research*, v.39, n.4, e25, 2008.

DETWILER, L. A.; BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie. *Revue scientifique et technique. Office International des Epizooties*, v.22, n.1, p.121-143, 2003.

DEARMOND, S. J.; PRUSINER, S. B. The neurochemistry of prion diseases. *Journal of Neurochemistry*, v.61, n.5, p.1589-601, 1993.

DOESCHL-WILSON, A. et al. Implications of Conflicting Associations of the Prion Protein (PrP) Gene with Scrapie Susceptibility and Fitness on the Persistence of Scrapie. *PLoS ONE*, v.4, n.11, e7970, 2009.

ELOIT, M. et al. BSE agent signatures in a goat. *Veterinary Record*, v.156, p.523-524, 2005.

ELSEN, J. M. et al. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Archives of Virology*, v.144, p.431-445, 1999.

ERSDAL, C. et al. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Veterinary Pathology*, v.40, p.164-174, 2003.

ESPENES, A. et al. Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, v.134, p.115-125, 2006.

ESPINOSA, J. C. et al. Scrapie: susceptibilidad/resistencia a la enfermedad. *Mundo Ganadero*, v.169, 2004.

FEDIAEVSKY, A. et al. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerging Infectious Diseases*, v.15, p.710-718, 2009.

FERNANDES, R. E.; REAL, C. M.; FERNANDES, J. C. T. "Scrapie" em ovinos no Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v.6, p.139-143, 1978.

FOSTER, J. D.; DICKINSON, A. G. Age at death from natural scrapie in a flock of Suffolk sheep. *Veterinary Record*, v.125, p.415-417, 1989.

FOSTER, J.; HOPE, J.; FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record*, v.133, p.339-341, 1993.

FOSTER, J. et al. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Veterinary Record*, v.138, p.546-548, 1996.

FRANSCINI, N. et al. Prion protein in milk. *PLoS ONE*, v.1, n.1, e71, 2006.

GAVIER-WIDÉN, D. et al. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.509-527, 2005.

GOLDMANN, W. et al. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.87, p.2476-2480, 1990.

GONZÁLEZ, L.; MARTIN, S.; JEFFREY, M. Distinct profiles of PrP^d immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *Journal of General Virology*, v.84, p.1339-1350, 2003.

GONZÁLEZ, L. et al. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Veterinary Pathology*, v.156, p.846-847, 2005.

GONZÁLEZ, L. et al. Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Veterinary Record*, v.158, p.325-331, 2006.

GONZÁLEZ, L. et al. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Veterinary Record*, v.162, p.397-403, 2008a.

GONZÁLEZ, L. et al. Adaptation and evaluation of a rapid test for the diagnosis of sheep scrapie in samples of rectal mucosa. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.20, p.203-208, 2008b.

GROSCHUP, M. An overview of diagnostic tests for prion disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p.49.

GROSCHUP, M. H. et al. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1201-1207, 2007.

HARRINGTON, N. P. et al. Prion genotypes of scrapie-infected Canadian sheep 1998-2008. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.74, p.228-232, 2010.

HARRIS, D. A. Cellular biology of prion disease. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, p.429-444, 1999.

HOINVILLE, L. J. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 15: 827-852, 1996.

HORIUCHI, M.; CAUGHEY, B. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *The EMBO Journal*, v.18, p. 3193-3203, 1999.

HUNTER, N. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends in Microbiology*, v.5, n.8, p.331-334, 1997.

HUNTER, N. The role of genetics in the epidemiology and pathogenesis of scrapie. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 26.

HUNTER, N. et al. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. *Veterinary Record*, v.141, p.137-140, 1997a.

HUNTER, N. et al. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Veterinary Record*, v.140, p.59-63, 1997b.

HOUSTON, F. et al. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, v.112, n.12, p.4739-4745, 2008.

JEFFREY, M. et al. Cellular and sub-cellular localization of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Archives of Virology*, v.16, p.23-28, 2000.

JEFFREY, M. et al. Onset and distribution of tissue PrP accumulation in scrapie-affected Suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *Journal of Comparative Pathology*, v.125, p.48-57, 2001.

JEFFREY, M. Scrapie: phenotypes, case definitions and strains. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p.35.

- KONOLD, T. et al. Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Veterinary Research*, v.4:14, 2008.
- LEE, I. Y. et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Research*, n.8, p.1022-1037, 1998.
- LIGIOS, C. et al. PrP^{Sc} in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nature Medicine*, v.11, p.1137-1138, 2005.
- MASTRANGELO, P.; WESTAWAY, D. Biology of the prion gene complex. *Biochemistry and Cell Biology*, v.79, p.613-628, 2001.
- McGOWAN, J. P. Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture*, v.5, p.365-375, 1922.
- MCKINTOSH, E.; TABRIZI, S. J.; COLLINGE, J. Prion diseases. *Journal of NeuroVirology*, v.9, p.183-193, 2003.
- MONLEON, E. et al. Approaches to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *Journal of Virology Methods*, v.124, p.165-171, 2005.
- MOUM, T. et al. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *Journal of General Virology*, v.86, p.231-235, 2005.
- NÖREMARK, M. Atypical scrapie in Europe – an epidemiologist’s view. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. *Abstracts...* London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 56.
- OLLHOFF, R. D.; SOTOMAIOR, C. S. Scrapie. *Boletim Técnico. Instituto Biológico*, v.24, p.54-60, 2011.
- O’ROURKE, K. I. al. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Veterinary Record*, v.142, p.489-491, 1998.
- O’ROURKE, K. I. et al. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.9, p.3254-3259, 2000.
- ORTIZ-PELAEZ, A.; BIANCHINI, J. The impact of the genotype on the prevalence of classical scrapie at population level. *Veterinary Research*, v.42, p.-8, 2011.
- PARAMITHIOTIS, E. et al. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nature Medicine*, v.9, n.7, p.893-899, 2003.
- POHL DE SOUZA, F. P. et al. Ocorrência de três casos de tremor enzoótico dos ovinos. In: IV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ESPECIALISTAS EM PEQUENOS RUMINANTES E CAMELÍDEOS SUL-AMERICANOS, 2005, Curitiba. *Anais...* Curitiba: AVEPER, 2005.
- PRCINA, M.; KONTSEKOVA, E. Has prion protein important physiological function? *Medical Hypotheses*, v.76, p.567-569, 2011.
- PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, v.216, p.136-144, 1982.
- PRUSINER, S. B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.95, p.13363-13383, Nobel Lecture, 1998.
- PRUSINER, S. B. An introduction to prion biology and diseases. In: PRUSINER, S. B. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004a, p.1-87.

PRUSINER, S. B. Development of the prion concept. In: PRUSINER, S. B. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004b, p.89-141.

PRUSINER, S. B. Early evidence that a protease-resistant protein is an active component of the infectious prion. *Cell*, v.116, p.109, 2004c.

PRUSINER, S. B. et al. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In: PRUSINER, S. B. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p.545-594.

RIBEIRO, L. A. O. Enfermidades de ruminantes diagnosticadas no CPVDF, RS. Anais. *Encontro de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário do Cone Sul*, 1, Campo Grande, p.89-95, 1996.

RIBEIRO, L. A. O.; RODRIGUES, N. C. Scrapie. *A Hora Veterinária*, v.120, p.15-22, 2001.

RIBEIRO, L. A. O. et al. Scrapie (paraplexia enzoótica) em ovinos no Brasil. *Veterinária em Foco*, v.4, p.203-209, 2007.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, A. B. et al. Atypical /Nor98 scrapie in Basque Country: a case report of eight outbreaks. *BMC Veterinary Research*, v.6: 17, 2010.

RYDER, S. et al. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Research in Veterinary Science*, v.76, p.211-217, 2004.

SCHREUDER, B. E. C. et al. Preclinical test for prion disease. *Nature*, v.381, p.563, 1996.

SIMMONS, M. M. et al. The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *Veterinary Research*, v.6: 14, 2010.

SORBY, R. et al. PrP Expression, PrP^{Sc} Accumulation and Innervation of Splenic Compartments in Sheep Experimentally Infected with Scrapie. *PLoS One*, v.4, e6885, 2009.

STEVENS, K. B.; DEL RÍO VILAS, V. J.; GUITIÁN, J. Classical sheep scrapie in Great Britain: spatial analysis and identification of environmental and farm-related risk factors. *BMC Veterinary Research*, v.5:33, 2009.

THACKRAY, A. M.; HOPKINS, L.; BUJDOSO, R. Proteinase K-sensitive disease-associated ovine prion protein revealed by conformation-dependent immunoassay. *Biochemical Journal*, v.401, p.475-483, 2007.

TOUZEAU, S. et al. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. *Archives of Virology*, v.151, p.735-751, 2006.

TYLER, J. W.; MIDDLETON, J. R. Transmissible spongiform encephalopathies in ruminants. *Veterinary Clinics – Food Animal Practice*, v.20, p.303-326, 2004.

VAN KEULEN, L. J. et al. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*, v.32, p.299-308, 1995.

VAN KEULEN, L. J. et al. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.5, p.1228-1231, 1996.

VARGAS, F. et al. Clinical characterization of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Veterinary Record*, v.156, p.318-320, 2005.

ZOU, W. Q. et al. Antibody to DNA detects scrapie but not normal prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.1380-1385, 2004.

WELLS, G. A.; WILESMITH, J. W. Bovine spongiform encephalopathy and related diseases. In: PRUSINER, S. B. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p.595-628.

Recebido em: jun. 2012

Aceito em: jul. 2012