

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**BIOPSIA DA MUCOSA RETAL E TERCEIRA PÁLPEBRA DE OVINOS E
OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA
PARA DIAGNÓSTICO DE PrP^{Sc} EM RUMINANTES**

Dissertação de Mestrado

Juliano de Souza Leal

PORTO ALEGRE
2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BIOPSIA DA MUCOSA RETAL E TERCEIRA PÁLPEBRA DE OVINOS E
OTIMIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA
PARA DIAGNÓSTICO DE PrP^{Sc} EM RUMINANTES**

Autor: Juliano de Souza Leal

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre Ciências Veterinárias na área de Patologia Animal

Orientador: David Driemeier

Co-Orientador: Rui Fernando Felix Lopes

PORTO ALEGRE
2009

L435b Leal, Juliano Souza

Biopsia da mucosa retal e terceira pálpebra de ovinos e otimização do protocolo de imuno-histoquímica para diagnóstico PrP^{Sc} em ruminantes. /

Juliano Souza Leal. – Porto Alegre: UFRGS, 2009.

59 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2009. David Driemeier, Orient.

1. Patologia veterinária 2. Imunoistoquímica 3. Scrapie: ovinos
4. Encefalopatia espongiforme: ovinos I. Driemeier, David, Orient. II. Lopes, Rui Fernando Félix, Co-orient. III. Título.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APROVADO POR:

**Profa. Dra Ana Lucia Schild,
Membro da Banca.**

**Prof. Dr. Aldo Gava,
Membro da Banca.**

**Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz,
Membro da Banca.**

RESUMO

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs), também conhecidas como doenças do príon, ocorrem tanto nos animais como no homem, são responsáveis por doenças transmissíveis e hereditárias e provocam lesões degenerativas no cérebro. A presença de uma forma anormal da proteína (PrP^{Sc}) no tecido encefálico e linforreticular é característica peculiar das EETs. Essa proteína é altamente insolúvel e resistente à degradação por proteases e se deposita eventualmente sob forma de placas amilóides na substância cinzenta. Tais placas provocam a morte maciça de neurônios e células gliais, causando vacuolização intensa no tecido afetado. Este trabalho consistiu na otimização da técnica de imuno-histoquímica para proteína priônica no tecido nervoso e no tecido linforreticular, como método diagnóstico de EETs em bovinos, ovinos e caprinos. Além disso, verificou-se a eficiência da utilização de folículos linfóides coletados por biópsia de terceira pálpebra e mucosa retal para o diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos. Entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008 foram realizados exames de imuno-histoquímica e coloração por hematoxilina-eosina em amostras de tecidos de 5571 ruminantes (4829 bovinos, 1 bubalino, 708 ovinos e 33 caprinos) obtidas em necropsias, biópsias e materiais enviados para diagnóstico em formalina 10% ou em blocos de parafina. Os anticorpos monoclonais anti-príon F89/160.1.5 e F99/97.6.1 foram utilizados na técnica de imuno-histoquímica. Todas as amostras de bovinos e a do bubalino analisadas foram negativas para PrP^{Sc}. Entre os 741 ovinos e caprinos pesquisados, foram diagnosticados 81 animais positivos, 16 suspeitos e, em 100 animais, o material foi insuficiente para o diagnóstico. Foram realizadas cinco repetições da imuno-histoquímica para cada amostra positiva para PrP^{Sc}. O diagnóstico por imuno-histoquímica no tecido linforreticular foi considerado positivo quando o material apresentava um número de no mínimo quatro folículos linfóides, com centros germinativos. Este trabalho inclui o primeiro diagnóstico positivo de scrapie na espécie caprina no Brasil, com marcação imuno-histoquímica nas tonsilas, terceira pálpebra e linfonodo. A marcação pela imuno-histoquímica em quatro ovinos da raça Santa Inês, todos com diagnóstico positivo nas tonsilas e linfonodos e um deles também com depósito de PrP^{Sc} na terceira pálpebra, surge como primeiro diagnóstico da doença nessa raça no Brasil. Os resultados considerados suspeitos ou insuficientes observados nas amostras de biópsias ou enviadas por terceiros indicam que há ajustes a serem estudados, especialmente quanto à coleta das amostras. O envio de material de vários órgãos linfóides possibilitaria a confirmação da presença ou não do agente em pelo menos dois deles, diminuindo o número de casos considerados suspeitos e o risco de falsos positivos. O envio de amostras de biópsia de tonsila, terceira pálpebra e mucosa retal, conjuntamente, reduziria o número de casos suspeitos e eliminaria grande parte, senão a totalidade dos casos com material insuficiente para diagnóstico.

Palavras-chave: Biópsia, scrapie, EETs, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), also known as prion diseases, occur in animals and humans and are responsible for transmissible and inherited disorders that cause fatal degenerations of the brain. A peculiar characteristic of TSEs is the conversion of a host-encoded glycoprotein termed prion protein (PrP), from a normal cellular form, PrP^C, to an abnormally folded isoform, PrP^{Sc}, present in the nervous and lymphoreticular tissues. The prion protein PrP^{Sc} is highly insoluble and resistant to the proteases degradation, eventually leading its accumulation, forming amyloid protein plates deposition in the brain gray substance. These plates cause massive death of neurons and glial cells, producing intense vacuolation in the affected tissue. In this work, the immunohistochemical procedures were optimized for prion protein in nervous and lymphoreticular tissues to provide diagnosis of TSEs in bovine, sheep and goat, and also to verify the efficiency of lymphoid follicles from third eyelid and rectal mucosa biopsies for the scrapie diagnosis in sheep and goats. Between January, 2005 and January, 2008 immunohistochemistry examinations and hematoxylin-eosin staining were accomplished in tissue samples from 5571 ruminants (4829 bovines, 1 water buffalo, 708 sheep and 33 goats), obtained from necropsies and biopsies, and samples of 10% formalin-fixed or paraffin embedded tissues submitted by other laboratories. The monoclonal antibodies anti-PrP F89/160.1.5 and F99/97.6.1 were used in the immunohistochemical procedures. All the samples from cattle and the water buffalo analyzed were negative to PrP^{Sc}. Among the 741 sheep and goats, there were 81 positive and 16 suspect samples, and 100 of them were insufficient to test. Five immunohistochemical repetitions were performed for each positive PrP^{Sc} sample. The immunohistochemistry diagnosis in the lymphoreticular tissues was considered positive when the material presented at least four lymphoid follicles with germinal centers. This work includes the first positive case in goats in Brazil (through immunohistochemical labelling in tonsils, third eyelid and lymph node) and the first four cases in Santa Inês sheep, by the same technique. The results considered as suspect or of insufficient sample indicate that some aspects associated with sample collection need further adjustment. The submission of samples from several lymphoid organs would probably make possible the confirmation or not of the agent presence in at least two of them, reducing the number of suspect and false positive cases. Simultaneous submission of biopsy samples from tonsil, third eyelid and rectal mucosa together could reduce the number of suspicious cases, besides of eliminating great part or even the totally of the insufficient samples.

Key-word: Biopsy, scrapie, TSEs, immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	Scrapie	9
2.1.1	Etiologia e Patogenia	9
2.1.2	Epidemiologia.....	11
2.1.3	Sinais Clínicos e Patologia	12
2.1.4	Diagnóstico.....	13
2.1.5	Controle e Profilaxia.....	15
2.2	Encefalopatia espongiforme bovina (EEB)	16
2.2.1	Etiologia e Patogenia	16
2.2.2	Epidemiologia.....	18
2.2.3	Sinais Clínicos	20
2.2.4	Patologia	21
2.2.5	Diagnóstico.....	23
2.2.6	Controle e Profilaxia.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Necropsias	28
3.2	Biopsias	29
3.3	Materiais Encaminhados por Terceiros	30
3.4	Protocolo de Imuno-histoquímica para EET	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)	33
4.2	Scrapie	34
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	ANEXO A	59

1 INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas, principalmente associadas com as encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs), modificaram enormemente o conceito sobre agentes infecciosos. As EETs ocorrem tanto no homem como nos animais e são responsáveis por doenças transmissíveis e hereditárias, podendo causar doença esporádica, na qual nem a transmissão nem a hereditariedade são evidentes. Provocam lesões degenerativas no cérebro e se caracterizam por vacúolos microscópicos e pela deposição de proteína amilóide na substância cinzenta. Nesta grande família estão incluídas as doenças Creutzfeldt-Jakob (CJD), Gerstmann-Scheinker (GSS), Kuru e insônia familiar fatal (FFI), em humanos; scrapie, em ovinos e caprinos e encefalopatia espongiforme bovina (EEB) (PRUSINER, 1995).

As EETs também são conhecidas como doenças do príon (do inglês, *proteinaceous infectious particle*) ou proteína priônica (PrP). A proteína celular normal (PrP^C; c=célula normal) está presente na membrana celular de vários tipos de células animais, mas principalmente nas do sistema nervoso central (SNC), linforreticular e muscular. Uma característica peculiar das EETs é a presença de uma forma anormal da proteína (PrP^{Sc}; Sc=scrapie) no tecido encefálico e linforreticular (baço, tonsilas e linfonodos). A proteína priônica PrP^{Sc} é altamente insolúvel e resistente à degradação por proteases, o que causa sua acumulação, formando placas de deposição, as quais causam a morte maciça de neurônios e células gliais e, conseqüentemente, vacuolização intensa no tecido afetado.

O tremor epizootico ovino, scrapie, *tremblent* ou paraplexia enzoótica dos ovinos foi a primeira doença a ser reconhecida dentro do grupo das EETs. Conhecida na Europa desde 1732, scrapie é uma desordem neurodegenerativa fatal de ovinos e caprinos, caracterizada principalmente pelo acúmulo de príon, agente transmissível móvel composto de proteína priônica na isoforma anormal PrP^{Sc} (PRUSINER, 1982). Considerada como uma doença infecciosa com transmissão contagiosa materna e lateral, onde fatores genéticos desempenham um papel central (SMITS *et al.*, 1997). Os animais podem ser portadores sadios da enfermidade (RIET-CORREA *et al.*, 2002). Não há ocorrência de focos inflamatórios (KIMBERLIN, 1990). É comum em ovinos e ocorre raramente em caprinos (WOOD *et al.*, 1992). A doença não afeta os humanos (WATTS *et al.*, 2006).

A encefalopatia espongiforme bovina (EEB), popularmente conhecida como “doença da vaca louca”, foi descoberta no sul da Inglaterra, em 1986. A partir deste episódio, a doença foi diagnosticada em bovinos de outros países da Europa, Ásia e América. Como outras EETs causa acúmulo da proteína priônica PrP^{Sc} em vários órgãos, principalmente no sistema

nervoso central (KIMURA & HARITANI, 2008). Esta condição degenerativa crônica e transmissível do sistema nervoso central de bovinos se caracteriza clinicamente por nervosismo e dificuldade de locomoção, principalmente dos membros pélvicos (BARROS & MARQUES, 2003). Desde o início da epidemia na Inglaterra, houve a preocupação de que a EEB apresentasse risco aos consumidores humanos de carne bovina. Um dos resultados dessa crescente preocupação é a solicitação, por parte das autoridades sanitárias internacionais, que os países exportadores de carne bovina apresentem evidências de que seus rebanhos são livres da doença e de outras encefalopatias transmissíveis. Assim, esses países devem ter um controle capaz de identificar as doenças que afetam o sistema nervoso de bovinos e de atestar que seu rebanho bovino é mantido sob vigilância contra qualquer tipo de EET, quer seja espongiiforme ou não, identificando e reconhecendo os casos de EEB, caso eles ocorram. A confirmação do agente da EEB como causa de uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) em seres humanos (BRUCE *et al.*, 1997; HILL *et al.*, 1997a) aumentou o controle por parte das autoridades internacionais.

A confirmação do diagnóstico das EETs é feita pelo exame convencional de microscopia através da coloração por hematoxilina e eosina (HE) em seções de tecido do tronco cerebral, na região do óbex. Outros critérios de diagnósticos também podem ser empregados, como a detecção de doenças específicas de fibrilas por microscopia eletrônica de transmissão (KIMBERLIN, 1990) e a detecção dos principais constituintes das fibrilas, ou proteínas anormais PrP^{Sc} (PRUSINER, 1989). A imuno-histoquímica é uma técnica prática que pode ser executada nos laboratório onde é realizado o diagnóstico das EETs em animais (SCHREUDER *et al.*, 1998b).

O Brasil, hoje, é considerado o principal produtor mundial de carne bovina, não só pela sua estrutura de produção e industrialização, mas também pela sua competitividade. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) reconhece que medidas de vigilância sanitária devam ser adotadas consistentemente para impedir a entrada das EETs no país ou seu rápido reconhecimento e controle, no caso de introdução. Para a obtenção de um número significativo de exames do sistema nervoso de bovinos, existe uma dependência do volume de material recebido pelos laboratórios, em função da rede de diagnóstico para a raiva já existente no país. Dessa maneira, a coleta de material para EEB poderia complementar o trabalho realizado pela rede de diagnóstico para a raiva e outras enfermidades do sistema nervoso de bovinos.

Os objetivos deste trabalho foram obter a otimização da técnica de imuno-histoquímica para proteína priônica infectante PrP^{Sc} no tecido nervoso do sistema nervoso

central (SNC) de ruminantes, além do exame em tecido linforreticular para diagnóstico seguro de EETs em ovinos e caprinos, bem como verificar a eficiência das técnicas de biopsia utilizando folículos linfóides de terceira pálpebra e mucosa retal para o diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Scrapie

2.1.1 Etiologia e Patogenia

O scrapie, tremor epizootico ovino, *tremblent* ou paraplexia enzoótica dos ovinos é uma doença neurodegenerativa fatal que ocorre naturalmente em ovinos e caprinos e é o arquétipo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) ou doenças priônicas (PARRY, 1962; BOSSERS *et al.*, 1996). Atualmente, é considerada como uma doença infecciosa com transmissão contagiosa materna e lateral, onde fatores genéticos desempenham um papel central (DICKINSON *et al.*, 1974; BELT *et al.*, 1995; SMITS *et al.*, 1997). A doença, provavelmente originária do rebanho merino espanhol, tem grande importância econômica na Europa e na América do Norte. Embora tenha sido introduzida em ocasiões na Austrália e na Nova Zelândia, a pronta identificação e o abate de ovinos importados têm mantido esses países livres da enfermidade (SARGISON, 1995).

Conhecida na Europa desde 1732, scrapie é caracterizada principalmente pelo acúmulo de príon (do inglês, *proteinaceous infectious particle*), agente transmissível móvel composto de proteína priônica (PrP), na isoforma normal PrP^C (c=célula normal) (PRUSINER, 1982). As doenças relacionadas com a isoforma anormal da proteína priônica (PrP^{Sc}; Sc=scrapie) são conhecidas por serem estritamente associadas com as EETs (McKINLEY *et al.*, 1983; FOSTER *et al.*, 1996). O scrapie foi a primeira doença do grupo das EETs, ou doenças priônicas, identificada em animais. Não há ocorrência de focos inflamatórios (KIMBERLIN, 1990) e não afeta humanos (WATTS *et al.*, 2006).

Scrapie é conhecido em ovinos e, raramente, foi encontrado em caprinos. A doença em caprinos é similar, afetando os animais que vivem com os ovinos, podendo ser registrados duas síndromes clínicas distintas: uma forma sonolenta e uma pruriginosa, com períodos de incubação diferentes (WOOD *et al.*, 1992).

A proteína priônica é codificada por um gene cópia única (gene *PRNP*) que foi localizado no cromossomo 13 de ovinos, sendo muito similar em outros mamíferos estudados (CASTIGLIONI *et al.*, 1998). Nos ovinos, o gene possui 31kb, sendo composto por dois íntrons curtos não codificantes e um único exon que contém a ORF (*open reading frame*); a sequência codificante completa de 771 nucleotídeos codifica uma proteína precursora de 256 aminoácidos (LEE *et al.*, 1998).

A sequência primária da proteína PrP^C é composta por diferentes regiões. Após a

transcrição, a proteína é processada para remoção dos 22 aminoácidos da região peptídeo sinal amino-terminal (aminoácidos 1-22), que controla a condução da proteína em direção ao retículo endoplasmático. Na região carboxi-terminal, 24 resíduos (aminoácidos 232-256) também são removidos durante a adição de uma molécula de glicofosfatidil inositol (GPI) que ancora a proteína à membrana celular (PRUSINER& SCOTT, 1997; LYSEK et al., 2005). A sequência dos aminoácidos 23-231 contém regiões importantes da PrP, onde há cinco cópias de octapeptídeos repetidos ricos em glicina, capazes de se unir com metais, principalmente o cobre. Tais repetições são conservadas entre as espécies e importantes pelo papel que executam na conversão de PrP^C em PrP^{Sc} (PRUSINER& SCOTT, 1997). Entre os 120 aminoácidos da região carboxi-terminal, há duas cisteínas conservadas que permitem a formação de pontes dissulfeto intramoleculares (WELKER *et al.*, 2002) e uma sequência que marca para a adição da âncora de GPI (aminoácidos 121-231) de importância estrutural para transporte intracelular da proteína em direção a membrana plasmática (PRUSINER& SCOTT, 1997; LYSEK et al., 2005).

A análise do gene *PrP* em ovinos está ligado ao polimorfismo com a susceptibilidade da doença (GOLDMANN *et al.*, 1991, 1994; HUNTER *et al.*, 1993; FOSTER *et al.*, 1996). Dentro da sequência de aminoácidos que codifica para a proteína PrP, existem numerosas variações que são encontradas em onze (101, 112, 136, 141, 143, 151, 154, 171, 172, 175 e 176) das quatorze posições da PrP ovina (ACIN *et al.*, 2004). Existem três grandes regiões do gene *PrP^{Sc}*, que estão ligados à suscetibilidade (GOLDMANN *et al.*, 1994; FOSTER *et al.*, 1996). As variações que apresentam os aminoácidos nas posições 136, 154 e 171 têm demonstrado afetar de um modo importante a susceptibilidade do animal à infecção. Na posição 136, podem ser encontrados os aminoácidos Alanina (A) e Valina (V); na posição 154 os aminoácidos Histidina (H) e Arginina (R) e, na posição 171, os aminoácidos Arginina e Glutamina (Q), Histidina e Lisina (K). Desta forma, a combinação V136R154Q171 em homozigose se encontra associada à máxima susceptibilidade frente ao scrapie e a combinação A136R154R171 em homozigose está associada à resistência frente à infecção (HUNTER *et al.*, 1993; FOSTER *et al.*, 1996). A infecção em heterozigose é rara. O polimorfismo na posição 171 está mais claramente ligado a variações na susceptibilidade ao scrapie. Entretanto, a presença do alelo R171 em homozigose e heterozigose confere maior resistência ao scrapie (BOSSERS *et al.*, 1996; 2000).

Em geral, pode-se dizer que a susceptibilidade está ligada aos homozigotos AA136RR154QQ171 e VV136RR154QQ171. A resistência se relaciona ao alelo A136R154R171, cuja presença reduz a susceptibilidade frente ao scrapie a tal ponto que a

maioria dos animais que portam esse alelo é resistente ao scrapie, existindo uma baixa susceptibilidade que varia de acordo com o alelo que o acompanha (HUNTER *et al.*, 1993; 1996).

Os graus de risco (R) para o scrapie são classificados em: R1) há risco muito baixo de scrapie no ovino em nível individual e risco baixo para a progênie de primeira geração; R2) o risco é baixo para o indivíduo e para a progênie de primeira geração; R3) risco baixo para o indivíduo, mas há algum risco para a progênie, dependendo do genótipo do outro genitor; R4) a scrapie pode estar ocasionalmente registrada no genótipo e uma alta proporção da progênie do ovino R4 está em risco, se comparada à progênie do ovino R3 e R5) o ovino corre grande risco de ser acometido por scrapie (DAWSON *et al.*, 1998).

Entretanto, sabe-se que para a ocorrência de scrapie é necessário que o animal tenha contato com o agente infeccioso. Portanto, não havendo este contato, a doença adquire um caráter exclusivamente genético (DAWSON *et al.*, 1998).

Análises de polimorfismo no códon 171, em diferentes raças do Brasil, demonstraram que de 172 ovinos Hampshire Down, 37,21% tinham genótipo suscetível (Q₁₇₁/Q₁₇₁) e de 129 ovinos Suffolk, 48,84% eram animais altamente suscetíveis (PASSOS *et al.*, 2008)

2.1.2 Epidemiologia

Scrapie foi diagnosticada em diversos países e é endêmica na Grã-Bretanha. No Brasil, o primeiro diagnóstico de scrapie foi publicado por Fernandes *et al.* (1978).

A doença ocorre naturalmente em ovinos e caprinos (FOSTER *et al.*, 1996) e afeta mais adultos, especialmente aos 42 meses e, raramente, com idade inferior a um ano (MANUELIDIS, 1997). A ocorrência natural de scrapie em ovelhas é fortemente influenciada por alterações genéticas do hospedeiro que codificam PrP (HUNTER, 1997). Esse polimorfismo influencia a conversão de PrP^C na isoforma patogênica PrP^{Sc} (BOSSERS *et al.*, 1997).

Mesmo sendo uma doença infecciosa e contagiosa, o processo biológico que rege a propagação natural de scrapie entre os ovinos é desconhecido, embora pelo menos, duas vias de transmissão sejam possíveis: a transmissão materna ou vertical, onde o cordeiro poderia se infectar de sua mãe e a transmissão lateral, onde a doença se espalha pelo contato de um animal infectado com scrapie para outro não infectado (BROTHERSTON *et al.*, 1968; DICKINSON *et al.*, 1974; RYDER *et al.*, 2004; FOSTER *et al.*, 2006).

A transmissão pode ocorrer pelo cérebro e tecido linforreticular de animais sub-clinicamente afetados (MANUELIDIS, 1997). Ocorre transmissão da ovelha para o cordeiro no período perinatal, sendo detectada a presença do agente na placenta (PATTISON *et al.*, 1974; MANUELIDIS, 1997). Não há relatos de que sangue, urina, sêmen e saliva sejam contagiosos (HADLOW *et al.*, 1982; MANUELIDIS, 1997). A transferência de embriões é um método seguro para muitos autores (FOOTE *et al.*, 1993; BRADLEY, 2001; WANG *et al.*, 2001). A inoculação iatrogênica de scrapie em vacinas é descrita (CARAMELLI *et al.*, 2001).

A contaminação pode acontecer em pastagens, equipamentos ou construções e é favorecida pela alta resistência do agente às condições ambientais. O maior risco de contaminação de animais sadios em contato com portadores ocorre em um período de até 60 dias após aborto ou parto de animal infectado (O'ROURKE *et al.*, 2002).

Franscini *et al.* (2006) relataram que a proteína priônica celular normal (PrP^C) está presente no leite de seres humanos e dos ruminantes. Embora os autores não considerem clara a possibilidade de transmissão de scrapie pelo leite ou colostro da ovelha para o cordeiro, essa possibilidade existe.

2.1.3 Sinais Clínicos e Patologia

Os sinais clínicos ou síndromes associadas com scrapie natural são distintos (HOUSTON & GRAVENOR, 2003; VARGAS 2005), inespecíficos e variáveis (SARGISON 1995). A maioria dos ovinos e caprinos exhibe mudanças comportamentais, prurido (manifestado como fricção ou mordedura de partes do corpo), ataxia e perda de peso. Os sinais clínicos observados em ovinos experimentalmente inoculados são similares, exceto pela duração dos sinais (que tende a ser mais curta) e perda de peso (que não é uma característica predominante) (DICKINSON *et al.*, 1965).

O prurido é manifestado pelo ato de esfregar os flancos, garupa, pescoço e cabeça contra objetos sólidos, (SARGISON, 1995; RIET-CORREA *et al.*, 2002; HOUSTON & GRAVENOR, 2003), mordedura nos membros e o coçar do tórax e membros anteriores com um dos membros posteriores, causando perda de lã e lesões na pele (RIET-CORREA *et al.*, 2002; SARGISON, 1995). O desenvolvimento da pele subjacente com a lã pigmentada (SARGISON, 1995) também é característico. Ataxia parece estar associada com déficit de propriocepção, exibição de ampla base em estação, tropeços, movimento oscilatório, maior abdução/adução dos membros posteriores e uma tendência de queda na virada brusca. A

gravidade da ataxia é variável entre os indivíduos e, em alguns casos, aumenta acentuadamente após estresse ou tratamento (HOUSTON & GRAVENOR, 2003; SARGISON, 1995).

Os sinais clínicos são observados, raramente, em animais entre um e três anos de idade, e são vistos mais comumente naqueles entre dois e cinco anos (SARGISON, 1995; FOSTER *et al.*, 2001). Embora o início dos sinais clínicos seja insidioso, a doença é sempre progressiva. O tempo de aparecimento dos sinais clínicos, decúbito e morte variam de uma semana a vários meses (SARGISON, 1995). Observações comprovam que quando a doença se torna endêmica em um rebanho, a idade do óbito dos animais diminui com o passar do tempo (KIMBERLIN, 1990). Quando perseguidos, os animais tropeçam e podem entrar em colapso. Os sinais de pressionar a cabeça contra a cabeça de outros animais, tremores, ranger de dentes e parada ruminal podem estar presentes em alguns casos. A perda de peso é variável, em alguns animais pode haver manutenção da condição corporal até a fase terminal da doença. Em rebanhos pouco supervisionados, a doença pode permanecer desconhecida até as fases terminais, quando ovinos são incapazes de se defender. A doença nos caprinos apresenta essencialmente os mesmos sinais que nos ovinos (SARGISON, 1995).

O agente infeccioso, príon, interfere com uma proteína similar do animal para causar a doença. Esta proteína normal (PrP^C) está presente na membrana celular das células do hospedeiro. Nas EETs, o tecido encefálico e o tecido linforreticular (baço, tonsila e linfonodos) apresentam uma forma anormal (PrP^{Sc}) da proteína (PRUSINER, 1997). Os animais podem ser portadores saudáveis da enfermidade (O'ROURKE *et al.*, 2002).

Alguma variabilidade quanto à neuropatologia, especialmente na intensidade e na distribuição da espongiose pode ocorrer devido às diferenças no agente infectante (PATTISON & MILLSON, 1961), embora o agente possa ser transmitido entre caprinos sem o contato com ovinos (BROTHERSTON *et al.*, 1968). A viabilidade da transmissão oral foi demonstrada na cabra (PATTISON & MILLSON, 1961) através da alimentação com fragmentos de cérebro infectado, sendo 109 vezes menos eficaz que a inoculação intracerebral (PRUSINER, 1985).

2.1.4 Diagnóstico

A confirmação do diagnóstico da doença dá-se pelo exame convencional de microscopia e coloração com hematoxilina e eosina (HE) de seções de tecido do tronco cerebral, na região do óbex (ROELS, 1999). No entanto, outros dois critérios diagnósticos são

também amplamente empregados: detecção de fibrilas específicas das doenças por microscopia eletrônica de transmissão (KIMBERLIN, 1990) e dos principais constituintes das fibrilas, ou proteínas anormais PrP^{Sc} (PRUSINER, 1989), por imuno-histoquímica.

A imuno-histoquímica é um método prático que pode ser executado em laboratório onde se realizam estudos para o diagnóstico das EETs em animais (SCHREUDER *et al.*, 1998b). A imuno-histoquímica para PrP permite avaliar o padrão de distribuição da forma anormal dessa proteína precipitada nos tecidos. A proteína normal da membrana celular (PrP^C) não existe em quantidade suficiente para ser visível nas técnicas de imuno-histoquímica existentes, uma vez que é uma proteína frágil e é destruída pela fixação em formol e pela inclusão em parafina. A sua isoforma anormal, mutada (PrP^{Sc}), por ser mais resistente e precipitar nos tecidos, não é perdida no processamento do material, servindo de antígeno para um anticorpo anti-PrP. Esta técnica permite detectar placas de pequenas dimensões que passariam indetectáveis nas colorações clássicas. O tempo de evolução clínica da enfermidade e o grau de espongiose influenciam na marcação, mas é possível encontrar marcação positiva em casos com mínima espongiose (GAVIER-WIDEN *et al.*, 2005).

A acumulação de PrP^{Sc} foi demonstrada durante a fase de pré tremor epizoótico nos linfonodos periféricos (IKEGAMI *et al.*, 1991; MURAMATSU *et al.*, 1993) e em folículos linfóides de tonsilas (SCHREUDER *et al.*, 1996). A presença de PrP^{Sc} na língua de ovinos infectados com tremor epizoótico natural foi descrita por Corona *et al.* (2006). Segundo esses autores, são necessários estudos para definir em que fase da doença ocorre envolvimento da língua e se haveria risco associado com a saúde pública, uma vez que aquela não está incluída na lista de risco específico.

Estudos têm sido realizados para encontrar um meio diagnóstico das EETs em animais vivos (ROELS, 1999). Schreuder *et al.* (1998b) sugeriram que a imuno-histoquímica de biopsias de tonsilas poderia ser utilizada com base em resultados obtidos sob circunstâncias experimentais. A PrP^{Sc} foi identificada em folículos linfóide de terceira pálpebra, ou membrana nictitante (O'ROURKE *et al.*, 2002) localização superficial, facilidade de acesso e possibilidade à anestesia local (THURING *et al.*, 2000). A sensibilidade do diagnóstico por imuno-histoquímica para esse tecido é estimada entre 85 e 90% (O'ROURKE *et al.*, 2002).

2.1.5 Controle e Profilaxia

Embora sejam possíveis as transmissões vertical e lateral (RYDER *et al.*, 2004;

FOSTER *et al.*, 2006), o processo biológico que rege a propagação natural de scrapie entre os ovinos é desconhecido, o que dificulta o controle da doença. Além disso, o agente infeccioso não é encontrado nas fezes, saliva e urina dos animais (HADLOW *et al.*, 1982) e a possibilidade de transmissão de scrapie da ovelha para o cordeiro via leite materno ou colostro não está completamente elucidada (FRANSCINI *et al.*, 2006).

O uso de bancos de leite e colostro são práticas comuns em rebanhos de ovinos e caprinos há muitos anos e não tem sido associado com epizootias de scrapie (KONOLD *et al.*, 2008). Entretanto, os criadores que visam reduzir o risco de introduzir scrapie não devem usar leite e colostro obtidos de outros rebanhos, especialmente aqueles onde tenha ocorrido tremor epizoótico nos últimos anos, ou aqueles, nos quais não se tenha conhecimento sobre a doença (KONOLD *et al.*, 2008). Nos rebanhos de ovinos e caprinos de alta produção leiteira, nos quais existem animais que podem ser mais sensíveis à scrapie, os criadores deverão considerar também o risco de propagação de scrapie através do *pool* de colostro e leite. Em rebanhos que estão sujeitos à obrigatoriedade de controle de scrapie, a utilização de substitutos de colostro ovino por leite bovino ou artificial deve ser considerada uma alternativa (GRESHAM *et al.*, 2008).

Não existe nenhum tratamento para scrapie e a vacinação não é possível porque a infecção não induz resposta humoral. A ausência de um teste diagnóstico sorológico no animal vivo obriga que o controle em um rebanho infectado inclua abate de animais com sinais clínicos e de seus parentes maternos, procedimento que exige identificação confiável e registros detalhados por várias gerações (SARGISON, 1995). Com diferentes áreas de parição em pastagem durante anos subsequentes, pode-se reduzir a contaminação. A utilização de carneiros de um ano de idade como reprodutores só é indicada após um período de dois a três anos, quando a prevalência de scrapie nos seus ascendentes for determinada (SARGISON, 1995).

A susceptibilidade do rebanho ovino depende em grande parte do padrão genético do animal e é determinada principalmente pelos genótipos da sequência do gene que codifica para a proteína PrP, já que existem diversos polimorfismos, afetando a conversão da proteína celular PrP^C em sua forma patológica PrP^{Sc} (BOSSERS *et al.*, 1997; 2000). Mesmo assim, não se pode considerar que exista uma única forma de príon de ovino, já que existem diversas estirpes de príon que se distinguem pelas suas características patológicas e bioquímicas, podendo afetar de um modo diferente a cada genótipo (HUNTER, 1992; ACIN *et al.*, 2004).

Entretanto, se não houver contato do animal com o agente infeccioso, a doença adquire um caráter exclusivamente genético. Assim, para manter essa enfermidade controlada,

a genotipagem seletiva e a não inclusão no rebanho de alelos potencialmente susceptíveis à scrapie é uma medida preventiva importante (ALETHÉIA, 2002).

2.2 Encefalopatia espongiforme bovina (EEB)

2.2.1 Etiologia e Patogenia

A encefalopatia espongiforme dos bovinos (EEB) é primeira em número de mortes entre as doenças neurodegenerativas. Essa doença, com acúmulo de proteína priônica (PrP) é observada em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central (WELLS *et al.*, 1994; 1998; 1999; KIMURA & HARITANI, 2008). Popularmente conhecida como “doença da vaca louca” é uma condição degenerativa crônica e transmissível do sistema nervoso central (SNC) de bovinos que se caracteriza clinicamente por nervosismo, reação exagerada a estímulos externos e dificuldade de locomoção, principalmente nos membros pélvicos (BARROS & MARQUES, 2003).

Após a descoberta no sul da Inglaterra, em 1986, em um bovino africano, mantido em um jardim zoológico (WELLS *et al.*, 1987), a doença foi diagnosticada em bovinos de outros países da Europa, Ásia e América. Uma vez que se caracteriza como doença degenerativa crônica e transmissível do SNC, desde o início da epidemia na Inglaterra, houve a preocupação de que a EEB apresentasse risco aos consumidores humanos de carne bovina. Um dos resultados dessa crescente preocupação é a solicitação, por parte das autoridades sanitárias internacionais, de que os países exportadores de carne bovina apresentem evidências de que seus rebanhos são livres da doença e de outras encefalopatias transmissíveis. Assim, esses países devem ter um controle capaz de identificar as doenças que afetam o sistema nervoso de bovinos e de atestar que seu rebanho bovino é livre de qualquer tipo de encefalopatia transmissível, quer seja espongiforme ou não, identificando e reconhecendo os casos de EEB, caso eles ocorram.

A EEB se tornou importante problema veterinário em bovinos ao longo das últimas décadas, mas não só a saúde animal está em jogo, também há implicações para a saúde pública. O reconhecimento do agente da EEB como uma possível causa de uma nova variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) em humanos (WILL *et al.*, 1996) havia colocado a EEB em evidência, a qual foi acentuada com a confirmação experimental da associação entre esta forma de CJD e da EEB (BRUCE *et al.*, 1997; HILL *et al.*, 1997a).

A proteína celular normal PrP (PrP^C) é uma sialoglicoproteína expressa nos

neurônios e glia do cérebro e medula espinhal, bem como em diversos tipos de células e tecidos periféricos, incluindo os leucócitos (BERG, 1994; BRANDER *et al.*, 1996; MILLSON *et al.*, 1997). A PrP^C desempenha um papel central na transmissão e patogênia da doença (BUELER *et al.*, 1993; BRANDER *et al.*, 1996) e a isoforma anormal PrP^{Sc} é um componente essencial da partícula priônica (BARRY & PRUSINER 1986; BRUCE *et al.*, 1997; PRUSINER, 1997). Embora PrP^C e PrP^{Sc} tenham a mesma sequência de aminoácidos, sua conformação estrutural parece ser diferente. PrP^C é rica em conteúdo α -hélices (cerca de 40%) e tem uma pequena estrutura folha- β , enquanto PrP^{Sc} tem menos α -hélices (cerca de 30%) e uma estrutura rica em folhas- β (cerca de 45%); esta diferença na estrutura secundária causa diferenças na sensibilidade à proteinase K e na solubilidade (PRUSINER & SCOTT, 1997). Dessa maneira, existem duas formas ou apresentações estruturais da mesma proteína, uma vez que a sequência de aminoácidos da PrP^C e da PrP^{Sc} é a mesma; entretanto, ao contrário da isoforma anormal, a PrP^C pode ser degradada por enzimas proteolíticas (BARROS & MARQUES, 2003).

O mecanismo pelo qual PrP^C é modificada para a isoforma causadora da doença PrP^{Sc} tem aspectos ainda desconhecidos (RYOU, 2007). O erro no dobramento que causa a formação da PrP^{Sc} corresponde à principal alteração conformacional de PrP^C, na qual é adquirida uma estrutura substancialmente composta por folhas- β . Estudos estruturais de PrP recombinante de humanos, bovinos, camundongos, hamsters e cervídeos para analisar a conformação rica em α -hélices da PrP^C têm revelado que a parte carboxi-terminal da molécula (aproximadamente os aminoácidos 130 a 241 na PrP bovina) forma três α -hélices e duas folhas- β curtas antiparalelas (RIEK *et al.*, 1996; DONNE, *et al.*, 1997; ZAHN *et al.*, 2000; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2000; GOSSERT *et al.*, 2005). Ao contrário, a porção amino-terminal da PrP (aproximadamente os aminoácidos 24 a 130 na PrP bovina) permanece menos definida, exceto pelos íons cobre que induzem uma organização limitada à região repetida octapeptídeo (GARNETT & VILES, 2003; BURNS *et al.*, 2003).

A maior ocorrência e expressão de PrP^{Sc} se relacionam com células do SNC, fundamentalmente, cérebro, cerebelo, medula e hipotálamo, e se caracterizam pela presença de vacúolos microscópicos e pela deposição de proteína amilóide (príon) na substância cinzenta do cérebro. Esse agente se acumula nos tecidos nervosos dos animais, causando a doença (BARROS & MARQUES, 2003).

A moléstia é transmitida de forma infecciosa, codificada pelo doador, porém a proteína que se acumula no hospedeiro receptor é codificada pelo próprio gene codificante do

PrP^C. A transmissão ocorre de maneira horizontal, autossômica dominante e não de forma vertical entre bovinos (DETWILER & RUBENSTEIN, 2000). As partículas de príon não possuem DNA ou RNA (PRUSINER, 1995).

A existência de diversidade em cepas priônicas tem suscitado um dilema quanto à forma como a informação biológica pode ser cifrada em qualquer outra molécula além de ácidos nucleicos (DICKINSON *et al.*, 1968ab; KIMBERLIN, 1990; BRUCE *et al.*, 1991; WEISSMANN, 1991; RIDLEY & BAKER, 1996). Príons de bovino, nyala, kudu e gatos domésticos foram inoculados para tipagem em ratos das cepas C57BL, VM, e F1 (DICKINSON *et al.*, 1968ab) e das cepas C57BL e 3VM (DICKINSON & MEIKLE, 1969; BRUCE & DICKINSON, 1987); todas essas cepas mostraram a mesma distribuição de incubação, o que sugere que todos eles são originados nos bovinos (BRUCE *et al.*, 1997).

2.2.2 Epidemiologia

As EETs adquiridas por contágio tiveram início na Inglaterra na década de 80 quando carcaças de ovelhas mortas por scrapie foram utilizadas como suplemento protéico em ração para bovinos. No final dessa mesma década, parte do rebanho bovino apresentava sintomas de EEB. Tal incidente causou a incineração desses animais e o bloqueio mundial ao consumo de carne bovina (e derivados) de origem inglesa (PRUSINER, 1995).

PrP^{Sc} é o principal e, muito provavelmente, o único componente infeccioso da partícula infectante. O processo de formação do PrP^{Sc} envolve apenas uma mudança conformacional do PrP^C (PAN *et al.*, 1993; BORCHELT *et al.*, 1990; CAUGHEY & RAYMOND, 1991). Estudos de modelagem molecular mostraram que o PrP^C é um mistura de quatro hélices de proteínas contendo quatro regiões de estrutura secundária (GASSET *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 1994). Estudos em ressonância magnética nuclear (NMR), espectroscopia de massa, dicroísmo circular (DC - fenômeno ótico em que cristais refletem duas cores, quando observados em diferentes ângulos), predição por análise computacional e raios infravermelho (FTIR) demonstraram que a estrutura secundária da PrP^C possui três domínios de α -hélice e uma estrutura folha- β antiparalela, tendo em sua extremidade carboxi-terminal uma sequência de sinal de ligação na membrana e uma âncora de glicosilinositol fosfolípido (GPI); na sua extremidade amino-terminal há uma região rica em sequências de octarepetições (PHGGGWGQ) cuja estrutura terciária é extremamente variada (PAN *et al.*, 1993; PERGAMI *et al.*, 1996; DAGGETT, 1998). Não existem modificações covalentes entre isoformas, mas a proteína priônica infecciosa PrP^{Sc} é rica em folhas- β (43%), enquanto que a

proteína PrP^C possui apenas 3% dessa estrutura terciária (PAN *et al.*, 1993; PERGAMI *et al.*, 1996).

O mecanismo de propagação das EETs se baseia na mudança da conformação da proteína PrP^C em uma forma mais estável, resistente à proteinase K, que se acumula no citoplasma e na superfície das células infectadas. Esta modificação pode ser espontânea, porém uma vez ocorrida, a isoforma infectante, agora chamada de proteína priônica (PrP^{Sc}), catalisa a conversão das demais proteínas PrP^C para a forma infecciosa (PRUSINER, 1995). Esse processo autocatalítico parece envolver um sistema endógeno de proteínas que auxilia na estabilização das estruturas terciárias das proteínas, as chamadas chaperonas moleculares (DAGGETT, 1998). Existem três maneiras de adquirir essas alterações: 1) um evento raro e espontâneo de surgimento da doença; 2) por contágio proveniente da dieta ou contaminação; ou 3) por mutações no gene *Prnp* (do inglês, *prion protein*), de caráter hereditário (WADSWORTH *et al.*, 1999).

O surgimento esporádico da doença ocorre porque a PrP^C, como outras proteínas celulares, possui flutuações da conformação terciária, passando para outras formas mais termodinamicamente favoráveis, conforme o ambiente celular em que se encontram. A conformação fisiológica e celular da PrP^C é favorecida por um ambiente oxidante que mantenha a ponte dissulfeto entre os aminoácidos 179 e 214 e que possua pH neutro, evitando assim a ionização dos demais aminoácidos da proteína (CAPELLARI *et al.*, 1999). Qualquer modificação neste ambiente celular pode potencialmente levar a um estágio de desnaturação parcial da proteína, o que facilitaria a conversão espontânea entre as isoformas. A transição *in vitro* espontânea de peptídeos construídos com estrutura α -PrP^C em β -PrP^{Sc} é possível modificando apenas o ambiente em que o peptídeo se encontra (MIHARA & TAKAHASHI, 1997). Em um ambiente redutor e em pH ácido, como é característico em organelas como o retículo endoplasmático, é possível verificar a conversão de α -PrP^C em β -PrP^{Sc} *in vitro*, e estes monômeros de β -PrP^{Sc} formam estruturas fibrilares estáveis, resistentes a proteases, que lembram agregados e placas amilóides. Este mecanismo descrito *in vitro* possui relevância *in vivo* devido aos ciclos de endocitose a que a proteína PrP^C está sujeita na presença de cobre, via esta que transita pelo retículo endoplasmático (PAULY & HARRIS, 1999). Estudos cinéticos de formação de agregados amilóides *in vivo* da proteína priônica mostram que há necessidade de formação de núcleos de agregamento, ou seja, pequenos agregados a partir dos quais grandes placas e fibras amilóides podem se replicar e levar ao rápido progresso no quadro clínico das EETs (DOBSON, 1999).

A incidência está relacionada com o polimorfismo da proteína PrP, causado por

mutações no gene *PRNP* em humanos. As trocas de aminoácidos por mutações pontuais modificam a estrutura terciária da proteína PrP^C, facilitando a inter-conversão entre as isoformas e, uma vez formada, a isoforma catalisa a mudança de conformação de fibras amilóides nas células (DOBSON, 1999). Apesar desses resultados indicarem que PrP^{Sc} tem sua formação envolvendo primariamente uma mudança conformacional na região amino-terminal, causando doenças priônicas herdadas, mutações foram encontrados em toda a proteína. Curiosamente, todos que conhecem mutações pontuais sabem que pode ocorrer tanto no interior da proteína PrP ou nas regiões adjacentes da estrutura secundária do PrP e, como tal, aparecem para desestabilizar a estrutura da PrP (HUANG *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 1995; RIEK *et al.*, 1996).

A preocupação pública com o potencial zoonótico resultante da doença ultrapassa as fronteiras da Europa, que determinou a necessidade de uma garantia através de um "seguro de cadeia alimentar". No início de epizootia dessa EEB, concluiu-se com base em dados epidemiológicos que as vacas contraíram a doença através da ingestão de farinha de carne e ossos infectada com o agente priônico, possivelmente originário de ovinos infectados com scrapie (WILESMITH *et al.*, 1988; 1991).

2.2.3 Sinais Clínicos

A apresentação clínica da EEB foi descrita no Reino Unido (WILESMITH *et al.*, 1988; 1992; HOINVILLE, 1993) e os sinais clínicos têm sido descritos em detalhes por diversos autores (WELLS *et al.*, 1987; WILESMITH & RYAN, 1992). A doença é caracterizada principalmente por alterações no comportamento, sensibilidade e locomoção. Em um estudo envolvendo 50 vacas com EEB, alterações do comportamento, sensibilidade e locomoção foram observadas em 96%, 98% e 88% dos animais, respectivamente (BRAUN *et al.*, 1998).

Não há predisposição relacionada ao sexo ou raça, nem susceptibilidade genotípica como ocorre com o scrapie em ovinos e caprinos. A idade média do aparecimento da doença é de cinco anos, podendo ocorrer a partir de dois anos com pico de aparecimento entre quatro e cinco anos (GODON & HONSTEAD, 1999). A faixa etária dos sinais clínicos de casos confirmados é muito grande (20 meses a 20 anos), apesar de EEB raramente ser confirmada em animais com idade inferior a 30 meses. A incidência de casos clínicos nas propriedades geralmente é baixa, em torno de 2%. A duração dos sinais clínicos é bastante variável, entre duas semanas a um ano (; WILESMITH *et al.*, 1988; 1992; McELROY & WEAVERS, 2001).

No entanto, a média de evolução da doença para a morte é de 14 semanas (BRAUN *et al.*, 1998).

Braun *et al.* (1998) afirmam que a EEB com uma semana de evolução poderia ser considerada um caso agudo, mas essa afirmação deve considerar que a habilidade em observar e interpretar os sinais clínicos varia muito entre proprietários e tratadores. Muitas vezes, os sinais iniciais de alterações de comportamento e sensibilidade não são observados.

O início dos sinais clínicos e sintomas associados com a doença são distintos e insidiosos (HOUSTON & GRAVENOR, 2003). A EEB é caracterizada clinicamente pela alteração do comportamento (nervosismo, agressividade, pânico, salivação, tremores), hiperestesia, falta de coordenação, marcha irregular (passada mais alta com os membros posteriores), hipersensibilidade ao toque e som, prurido (manifestado como roçar partes do corpo em objetos), ataxia e perda gradual do peso com diminuição na produção de leite (WILESMITH *et al.*, 1988; WINTER *et al.*, 1989; BRAUN *et al.*, 1998; HOUSTON & GRAVENOR, 2003).

O diagnóstico diferencial da EEB é complexo (COCKCROFT, 1999). O exame neurológico deve observar comportamento, postura, atitude geral, sensibilidade superficial e profunda, função dos nervos cranianos e líquido cérebro-espinhal.

O período de incubação da EEB é de aproximadamente cinco anos e, uma vez instalada, a doença evolui para óbito do animal em um período que varia de uma a 14 semanas. Os sinais clínicos são variados e vão desde estágios iniciais, onde se observa apenas perda de peso e diminuição na produção do leite até as fases da doença em que o animal se mostra geralmente atáxico e agressivo (BRAUN *et al.*, 1998). Os principais sinais observados em animais acometidos com a doença são apresentados no Anexo A.

2.2.4 Patologia

O agente causador da EEB não induz resposta imune ou inflamatória (BARROS & MARQUES, 2003). Em 1981, a partir de extratos purificados de cérebro de hamster inoculados com o agente do scrapie, demonstrou-se que a capacidade infectante desse agente dependia de uma proteína hidrófoba, definida posteriormente como uma glicoproteína (BOLTON *et al.*, 1985), denominada príon (do inglês, *proteinaceous infectious particle*) ou PrP (do inglês, *Protease resistant Protein*) (PRUSINER, 1982). Entretanto, a proteína não era encontrada em cérebros de hamsters normais (BARROS & MARQUES, 2003).

A EEB tem sido transmitida experimentalmente por inoculação intracerebral em

várias espécies como suínos (DAWSON *et al.*, 1990), bovinos, ovinos e caprinos (FOSTER *et al.*, 1993), camundongos (FRASER *et al.*, 1992; BRUCE *et al.*, 1994), marmota (BAKER *et al.*, 1993), marta (ROBINSON *et al.*, 1994) e macacos (LASMÉZAS *et al.*, 1996). A transmissão do agente da EEB para ovinos se comprova por diferentes rotas. No entanto, existe pouca informação publicada sobre os sinais clínicos. Em um estudo de Foster *et al.* (2001), o curso clínico foi de curta duração (menos de uma semana), com a apresentação predominante de ataxia e poucos indícios de prurido. No entanto, há relatos de inoculação artificial com o agente causador de EEB em ovinos, com ocorrência de prurido intenso e ataxia em um curso clínico da doença com mais de três meses, o que é mais típico de scrapie (BARON *et al.*, 2000). Distintas cepas de EETs são associadas com diferentes sinais clínicos em caprinos (FOSTER *et al.*, 2001) e hamsters (BESSEN & MARSH, 1992).

A distribuição dos acumulados de PrP varia em função da espécie animal e do tipo de doença. O acúmulo de PrP em bovinos com EEB tem sido confirmado no cérebro, medula espinal, gânglios espinal, retina, medula óssea e íleo distal em bioensaios utilizando bovinos e camundongos (WELLS *et al.*, 1994; 1998; 1999; KIMURA & HARITANI, 2008). O agente tem predominância cerebral, manifestando-se, na maioria das vezes, mas não na totalidade, na superfície dos neurônios do cérebro, sobretudo do neocórtex, neurônios do tálamo e do hipocampo, mas também nos neurônios dos gânglios raquidianos e do sistema nervoso periférico. As alterações espongiiformes encontradas no exame microscópico deram o nome à doença (BARROS & MARQUES, 2003).

Em bovinos afetados pela EEB, além do sistema nervoso, o príon foi encontrado em vísceras como, baço, rins, coração, pulmões, pâncreas, porção distal do íleo e medula óssea. Não foram encontradas evidências de infectividade no leite e na carne (BARROS & MARQUES, 2003). A forma patológica príon não é metabolizada corretamente e se acumula principalmente no sistema nervoso central e tecidos linfóides (BERG, 1994; BRANDER *et al.*, 1996; MILLSON *et al.*, 1997).

2.2.5 Diagnóstico

No cérebro, a acumulação rápida e consistente do PrP^{Sc} em lesões vacuolares na medula oblonga, em nível do óbex, tornam esta zona cerebral um ótimo sítio para diagnóstico de EEB, CWD (Chronic Wasting Disease, que ocorre em alces) e scrapie. A amostra adequada para diagnóstico de EEB deve incluir os núcleos solitários e núcleos do trato trigêmeal (WELLS *et al.*, 1989; VAN KEULEN *et al.*, 1995; RYDER *et al.*, 2001; SPRAKER *et al.*,

2002b).

Historicamente, os princípios e aplicações do diagnóstico inicial de EET foram baseados nas alterações histopatológicas. O papel central desempenhado pela proteína priônica na patogênese e a caracterização do PrP^C e do PrP^{Sc} têm sido elementos de grande investigação. Com o tempo, muitos anticorpos específicos contra PrP foram produzidos. Métodos baseados em técnicas como imuno-histoquímica (VAN KEULEN *et al.*, 1995; SPRAKER *et al.*, 2002a), análises de *Western blotting* (MADEC *et al.*, 2000; WELLS *et al.*, 1989), ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) (GRASSI *et al.*, 2001) e conformação dependente do ensaio imunoenzimático - CDI (BELLWORTHY *et al.*, 2005), estão cada vez mais sendo utilizados para diagnóstico, rastreamento, estudo da patogênese e fornecimento de informações comparativas em nível molecular.

Níveis de PrP^{Sc} no cérebro são inicialmente restritos a área-alvo, o óbex e, em seguida, aumentam e se expandem durante o curso da doença. Uma grande proporção de casos de EETs é detectada através de testes rápidos (*Western blotting* e ELISA), durante a fiscalização no abate em animais clinicamente saudáveis e que não apresentam alterações histopatológicas no cérebro. Isto se deve ao fato de que a PrP^{Sc} pode ser detectada no cérebro alguns meses antes do desenvolvimento das lesões e do aparecimento de sinais clínicos da doença (GRASSI, 2003; WELLS *et al.*, 1998).

Em muitos casos, a PrP^{Sc} é detectada no líquido céfalo-raquidiano (LCR) mais cedo que no cérebro, exceto para os ovinos com genótipos resistentes ou de pouca acumulação periférica (JEFFREY & GONZALEZ, 2004). Ensaio de cérebro e tecido linfóide fornecem maior sensibilidade na detecção, pelo menos em ovelhas (JEFFREY & GONZALEZ, 2004) e alces (SPRAKER *et al.*, 2004), mas não em cervos (HIBLER *et al.*, 2003). Tecidos linfóides de escolha incluem os gânglios linfáticos retro-faríngeos mediais e as tonsilas devido à sua acessibilidade para amostragem e sua estreita associação com o trato gastrintestinal. Devido à distribuição consistente do PrP^{Sc} em folículos linfóides, torna-se importante incluir o córtex dos linfonodos na amostra. O PrP^{Sc} é muito resistente à degradação e a sua detecção não é significativamente comprometida pela autólise (DEBEER *et al.*, 2001; CHAPLIN *et al.*, 2002; WEAR *et al.*, 2005).

A maioria dos métodos de diagnóstico para detecção PrP^{Sc} dependem da sua resistência à protease e da identificação pela utilização de anticorpos PrP. No entanto, uma dificuldade fundamental com anticorpos em EETs é que não podem discriminar especificamente PrP^C de PrP^{Sc}. Nos últimos anos, se tem buscado diferenciar anticorpos monoclonais para as duas proteínas (KORTH *et al.*, 1997; SERBEC *et al.*, 2003). Entretanto,

até o momento, nenhum desses anticorpos monoclonais se revelou apropriado para a identificação do PrP^{Sc} através da imuno-histoquímica (VAN KEULEN *et al.*, 1995; SPRAKER *et al.*, 2002a) e sua aplicação em outros testes diagnósticos continua sendo pesquisada.

Há diferenças nas sequências protéicas entre as espécies. Assim, alguns anticorpos contra sequências altamente conservadas das proteínas são muito reativas em uma espécie e pouco reativas em outras. Vários fatores estão envolvidos com uma detecção sensível da configuração da proteína, uma vez que existem epítomos diferentes e sítios de clivagem precisos para as diferentes formas da proteína priônica. Esses fatores são geralmente controlados pelas técnicas e, muitas vezes, o que é adequado para uma técnica não é para outra. Este é o caso dos anti-fosfolípidos que são adequados para análise imuno-histoquímica e não são necessariamente adequados para a análise em *Western blotting* ou ELISA. Da mesma forma, o nível de expressão do PrP^C varia entre os tipos de tecido, e como os anticorpos para tecidos não neurais estão disponíveis mais facilmente, podem não funcionar em tecido nervoso (MOUDJOU *et al.*, 2001).

Atualmente, não existem provas irrefutáveis não invasivas para o diagnóstico de EET em animais vivos ou seres humanos. Sinais clínicos da doença, embora característicos, não são suficientes para um diagnóstico definitivo. Assume-se que o sistema imunológico não consegue gerar uma resposta específica para PrP^{Sc} porque a proteína não é reconhecida como estranha. Atualmente, testes imunológicos que são baseados em detecção de uma resposta imune não podem ser usados para diagnóstico das EETs. Foi demonstrado que PrP^{Sc} está presente no sistema sanguíneo e que a EET pode ser transmitida pela transfusão de sangue (HUNTER *et al.*, 2002). No entanto, a concentração de PrP^{Sc} no sangue é de 100 a 1000 vezes menor do que no cérebro (GRASSI, 2003). O PrP^{Sc} também é detectado em baixas concentrações na urina de humanos e em animais afetados por EET (SHAKED *et al.*, 2001). Ainda que o desenvolvimento de testes *in vivo* de urina ou sangue tenha feito progressos (SCHMERR *et al.*, 1998), ainda não foram alcançadas sensibilidade e coerência suficientes. Alguns testes já estão disponíveis comercialmente, mas seu desempenho ainda não está claramente estabelecido.

A detecção do PrP^{Sc} em tecidos de biopsia continuam a ser o único método confiável para diagnosticar EET em indivíduos vivos. A biopsia tonsilar é utilizada em cervídeos, pequenos ruminantes e no homem. Em ovinos, a biopsia dos linfóides depositados sobre a terceira pálpebra também pode ser usada (O'ROURKE *et al.*, 2000), mas em muitos casos, obtém-se tecido linfóide insuficiente. A distribuição precoce do PrP^{Sc} no tecido linfático não é

homogênea; portanto, considera-se que, quando se destinam à análise imuno-histoquímica, um número mínimo de folículos linfáticos (normalmente de 4 a 6) com centros germinativos deve ser analisado para fornecer um diagnóstico negativo confiável. Biopsia de cérebro é o último recurso para confirmação de EET em humanos e somente um diagnóstico positivo é confiável.

Os testes rápidos têm alta sensibilidade e podem ser concluídos em 24 horas, mas geralmente são finalizados em poucas horas. A maioria dos testes rápidos é baseada em ELISA ou métodos de *Western blotting*, mas a análise imuno-histoquímica também é usada para triagem da doença CWD. Diversos tipos de ELISA têm sido desenvolvidos para o diagnóstico das EETs usando o cérebro (óbex) ou amostras de linfonodos. O tecido é homogeneizado, submetido ao tratamento com proteinase K e centrifugado. O sedimento é ressuspenso, diluído, e testado utilizando ELISA (GRASSI *et al.*, 2001).

Testes confirmatórios de alta especificidade são utilizados para confirmar a suspeita clínica da doença. Na maioria dos países, apenas casos confirmados de EEB e scrapie são considerados positivos. Os métodos recomendados como testes confirmatórios foram descritos e consistem em exame histológico, análise imuno-histoquímica, detecção do scrapie associada com análise por *Western blotting* (WELLS *et al.*, 1989; MADEC *et al.*, 2000). O estudo histológico com diagnóstico positivo para EEB, scrapie e CWD pode ser baseado na histopatologia, somente quando apresentar as alterações vacuolares específicas nas regiões neuroanatômicas reconhecidas. Diagnóstico em casos sem lesões, lesões leves ou equívocas precisam ser confirmadas pela utilização de métodos mais sensíveis, como imuno-histoquímica ou análise por *Western blotting* (WELLS *et al.*, 1989; WELLS & WILESMITH, 1995; SIMMONS *et al.*, 1996).

Reconhecendo a presença da doença específica por imunocoloração nas áreas alvo e com padrões característicos, a imuno-histoquímica é o teste para o diagnóstico das EETs mais específico disponível até o momento. A imunoanálise geralmente é realizada com amostras fixadas em formol. Utiliza-se um pré-tratamento das secções histológicas com ácido fórmico e autoclavagem para a exposição dos epítomos e a remoção da PrP^C normal (VAN KEULEN *et al.*, 1995). Alguns protocolos incluem também a digestão proteolítica. Uma gama de anticorpos monoclonais e policlonais anti-PrP podem ser utilizados e estão disponíveis comercialmente em um número cada vez maior. Alguns têm melhor desempenho em uma determinada espécie e outros são espécie-específicos. A análise imuno-histoquímica também é utilizada como um teste de rastreamento para a doença CWD e é utilizada como o teste oficial para a esta doença na vigilância de cervídeos em cativeiro nos EUA (SPRAKER *et al.*,

2002a,b). Quando se trabalha com material de EEB, muitos laboratórios incluem tratamento concentrado de ácido fórmico em tecido para bloquear ou diminuir os níveis de infectividade (TAYLOR, 2000).

O reconhecimento da confiabilidade do diagnóstico clínico de diversos sinais é útil para reduzir a incidência de diagnósticos falsos negativos e falsos positivos. Medidas de confiabilidade de diagnóstico devem incluir sensibilidade, especificidade e precisão de controles positivos e negativos (BRAUN *et al.*, 1998).

2.2.6 Controle e Profilaxia

No Reino Unido, no final dos anos 1970 e início dos 1980, as condições de beneficiamento e transformação dos produtos de origem animal para utilização como farinha de carne e ossos (“*rendering*”) haviam sido alteradas para que, aparentemente, o agente da EEB fosse inativado de maneira eficiente; porém, acredita-se que este processamento para o reaproveitamento do material infectado com EEB em bovinos foi ineficiente, sendo o fator-chave na condução da epizootia (PRUSINER, 1997). Os riscos associados com a importação de produtos de origem animal, possivelmente contaminados com a EEB, ou de animais infectados com esta doença e a possibilidade de que a EEB poderia surgir como resultado do reaproveitamento de animais infectados com scrapie levou à re-avaliação do “*rendering*” em países europeus (PRUSINER, 1997).

A dificuldade de inativação dos agentes causadores das EETs havia sido diagnosticada antes do estabelecimento do processo de inativação térmica do EEB e de estudos com os agentes causadores de scrapie e CJD (KIMBERLIN *et al.*, 1983; TAYLOR, 1991). Para a inativação da maior parte das estirpes de scrapie, o aquecimento úmido em câmara hiperbárica, em pressões de 20 psi (2,4bar) a 126°C parecia ser eficaz. Para a estirpe de scrapie 22a, a mais termo-resistente, quatro minutos de exposição em 30 psi (3,1bar) a 136°C provaram ser eficazes, em autoclave, utilizando procedimentos com carga porosa. No entanto, os resultados dos estudos posteriores se revelaram menos tranquilizadores (TAYLOR *et al.*, 1994).

A resistência da EET às condições de calor seco foi ainda mais marcante (BROWN *et al.*, 1990). O primeiro experimento com “*rendering*” de material contaminado com o agente da EEB foi relatado por Taylor *et al.* (1995) e foi seguido pelos estudos semelhantes com materiais infectados por scrapie (TAYLOR *et al.*, 1997). Dessa maneira, materiais como ossos podem ser utilizados para a alimentação dos mamíferos, se tiverem sido produzidos por

um processo em câmara hiperbárica por pelo menos 20 minutos a uma temperatura de 133°C em 3bar (SCHREUDER *et al.*, 1998a). Entretanto, não havendo tratamento possível, a única medida profilática efetiva é a eliminação radical da proteína proveniente de mamíferos das rações animais, particularmente as farinhas de carne e ossos (BRAUN *et al.*, 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Setor de Patologia Veterinária (SPV) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008. Foram analisadas amostras de tecidos e órgãos de ruminantes de diversas localidades do Brasil. As amostras de tecidos utilizadas para a realização do trabalho foram divididas em três grupos: 1) amostras colhidas em necropsias de bovinos, ovinos, caprinos e bubalino; 2) amostras colhidas em biopsias de ovinos; e 3) amostras de bovinos, ovinos e caprinos, encaminhadas por terceiros ao SPV-UFRGS, fixadas em formalina 10% ou em blocos de parafina.

Com exceção das amostras enviadas em blocos de parafina, que somente foram utilizadas para o diagnóstico imuno-histoquímico de EETs, todo o material foi processado pelas técnicas convencionais de rotina histológica que incluem desidratação, clarificação, impregnação e inclusão em parafina. Cortes de 4 μ m foram colocados em banho-maria a 60°C, colhidos com lâminas histológicas cobertas com albumina e submetidos à coloração pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), de acordo com o protocolo de Prophet *et al.* (1992). Para a técnica de imuno-histoquímica, os cortes de 4 μ m foram colhidos em lâminas livres de albumina (lâminas ImmunoSlide®, EasyPath) produzidas por um processo que atrai eletrostaticamente as seções de tecido congelados ou incluídos em parafina, aderindo-as à lâmina.

3.1 Necropsias

Durante o período de janeiro de 2005 a janeiro de 2008, foram realizadas 176 necropsias: 108 bovinos, 56 ovinos, 11 caprinos e 1 bubalino. Dados epidemiológicos e clínicos dos animais necropsiados foram obtidos com proprietários, técnicos agrícolas e/ou médicos veterinários representantes das propriedades e também pela inspeção dos animais no momento da chegada na propriedade ou no SPV/UFRGS.

Entre os animais necropsiados, apenas em dois ovinos foram relatados sinais clínicos compatíveis com scrapie. A maioria dos animais (89 bovinos e 40 ovinos) foi trazida viva ao SPV/UFRGS e sacrificada para a realização da necropsia. Como método de eutanásia se utilizou a anestesia com 2mg/kg cloridrato de xilazina (Dopaser®, Laboratórios Calier) intravenosa e posterior administração de solução hipersaturada de sulfato de magnésio intravenosa. As necropsias foram realizadas por grupos de três pessoas e a organização do

material e registro das alterações macroscópicas observadas foi executada por um quarto indivíduo.

Nas necropsias de bovinos e do bubalino foram coletadas amostras de diversos órgãos, porém para o exame de EEB foi encaminhado apenas o encéfalo. Durante o ano de 2005, o único material de ovinos e caprinos encaminhado para análise de scrapie foi o SNC. A partir de 2006, além do SNC, também foram encaminhados para análise linfonodos, tonsila palatina, baço, intestino delgado (íleo), mucosa retal e terceira pálpebra.

Todo material com destino ao exame histopatológico foi fixado o mais rápido possível, tendo em vista que o manuseio, principalmente do tecido nervoso não-fixado, causa artefatos que prejudicam a avaliação histológica das lesões. A fixação do material foi efetuada com formalina 10% (apresentação comercial da solução de formaldeído diluído em água). Após fixação em formol, o material foi processado para produção de lâminas histológicas. No caso do encéfalo bovino, bubalino, ovino e caprino, os cortes utilizados para o diagnóstico de EET foram obtidos do tronco encefálico na região do óbex.

A coleta de mucosa retal de ovinos e caprinos foi realizada conforme descrição de Espenes *et al.* (2006). Todo o material coletado foi processado para exame histológico e imuno-histoquímico conforme descrito por O'Rourke *et al.* (2002).

3.2 Biopsias

No período indicado anteriormente, foram realizadas biopsias em 395 ovinos no Estado do Rio Grande do Sul. De todos os ovinos foram colhidos fragmentos de tecido linfóide de terceira pálpebra e da mucosa retal, encaminhados para análise histológica e imuno-histoquímica para PrP^{Sc}.

Cada ovino submetido à biopsia foi primeiramente colocado em decúbito lateral e contido manualmente, para administração do colírio oftalmológico (Visalmim[®], cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, Lab. Bunker) em um dos olhos, geralmente o esquerdo. Em todos os casos, a imobilização da cabeça foi indispensável para coleta de material. Um operador realizou a contenção da cabeça e do corpo da ovelha, outro operador fazia a coleta do tecido linfóide da terceira pálpebra e uma terceira pessoa realizava a biopsia da mucosa retal. Em todos os procedimentos, as condições de segurança foram respeitadas, seja para o animal, seja para os operadores.

Após a imobilização adequada do animal, a terceira pálpebra era coletada. O tecido linfóide bulbar era visualizado sobre a superfície como um tecido protuberante ligeiramente

róseo, na porção medial, em ambos os olhos. A cor, a localização e o tamanho do tecido mostraram pouca variação entre os indivíduos. A amostra foi coletada mesmo quando não havia evidência visual marcante de tecido linfóide. A mucosa da terceira pálpebra foi pinçada, levemente tracionada para afastá-la do tecido conjuntivo subjacente e, com auxílio de uma tesoura curva Metzenbaum, foi realizado um corte látero-medial para retirada da amostra. Normalmente, foram necessários dois ou três cortes sequenciais com a tesoura para adquirir a biopsia de um único exemplar com tamanho suficiente, contendo toda a área do tecido linfóide de um dos lados da linha mediana. A biopsia foi fixada em formol tamponado 10% neutro durante, pelo menos, 24 horas.

A coleta da biópsia da mucosa retal foi realizada após a coleta da biopsia de terceira pálpebra. A administração de 0,5ml de cloridrato de lidocaína 1% sem vasoconstritor (Lab. Cristália) na mucosa era realizada inicialmente. Um espécuro vaginal de tamanho médio foi introduzido no reto do animal para permitir o pinçamento da mucosa retal. Outro conjunto de pinça e tesoura curva foi utilizado para excisão, por corte único, de um fragmento da mucosa retal, coletado aproximadamente a dois centímetros da linha de junção reto-anal, de forma dorso-ventral. Após a coleta da amostra e a retirada do espécuro foi realizada a administração tópica de repelente, cicatrizante em aerosol (Bactrovet Prata AM[®], Lab. KÖNIG do Brasil). As amostras de biopsia de mucosa anal também foram fixadas em formol tamponado 10% neutro durante pelo menos 24 horas.

O processamento das amostras para a análise histológica e imuno-histoquímica para PrP^{Sc} foi realizado de acordo com a metodologia descrita por O'Rourke *et al.* (2002). As biopsias retais de ovinos foram coletadas e processadas, conforme descrito por Espenes *et al.* (2006).

3.3 Material Encaminhado por Terceiros

No período do estudo, foram encaminhadas, ao SPV/UFRGS por terceiros, amostras de tecidos e órgãos de 4721 bovinos, 257 ovinos e 22 caprinos. As amostras encaminhadas em formalina 10% ou em blocos de parafina eram de fragmentos de encéfalo, tronco cerebral ou cerebelo (bovinos) e de encéfalo, baço, linfonodos, tonsila palatina e terceira pálpebra (ovinos e caprinos).

O material encaminhado em blocos de parafina foi submetido somente ao diagnóstico de EETs por imuno-histoquímica. O processamento do material enviado em formalina para análise histológica e imuno-histoquímica, foi realizado conforme descrito

anteriormente, no início do item 3.

3.4 Protocolo de Imuno-histoquímica para EET

Os cortes histológicos submetidos à técnica de imuno-histoquímica foram processados de acordo com o protocolo adaptado a partir daqueles descritos por O'Rourke *et al.* (2002) e Espenes *et al.* (2006). Após serem secados a 60°C por 12 horas (mínimo), os cortes foram desparafinados e tratados com 10% de peróxido de hidrogênio em metanol (MERK), por 20 minutos (para redução da peroxidase endógena), lavados em água destilada e tratados com ácido fórmico (MERK) por cinco minutos. Em seguida foram realizadas em sequência, lavagem com água destilada e TBS (Tris base, Tris-HCl, NaCl; DAKO[®], DAKO Corp., Carpinteria, CA), por dois minutos, lavagem rápida com 0,1% de Tween (SIGMA) diluído em TBS, por um minuto, lavagem em água destilada, por um minuto, tratamento com proteinase K (solução diluída em 50mM de Tris-HCL, 15 mM de azida sódica, pH 7,5; DAKO[®], DAKO Cytomation), por um minuto, e lavagem em água destilada gelada. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico[®], Nestlé) na diluição de 5%, por vinte minutos, e lavados em TBS, por dois minutos. Os anticorpos monoclonais anti-príon F89/160.1.5 e F99/97.6.1 (DAKO Corp., Carpinteria, CA) foram acrescentados na diluição de 1:500 e os cortes foram incubados a 37°C em câmara úmida, por períodos de duas a 12 horas. Posteriormente, os cortes foram tratados com anticorpo secundário biotinalado (DAKO LSAB 2 kit[®], DAKO Corp., Carpinteria, CA), por 20 minutos, lavados e tratados com o conjugado estreptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA), por mais 20 minutos, lavados e expostos ao cromógeno diaminobenzidina (DAB - DAKO Corp., Carpinteria, CA) por um minuto. Em seguida, os cortes foram contracolorados com hematoxilina, por 30 segundos. As lâminas foram lavadas e desidratadas, clarificadas em xilol e montadas com bálsamo sintético. Como controle positivo foi utilizado um corte histológico de cérebro, região do óbex, e de tecidos linfóides de ovino comprovadamente diagnosticado como positivo para scrapie. Como controle negativo foi utilizado material de cérebro e órgãos linfóides de outros animais com diagnóstico negativo para scrapie e de cérebro de bovino negativo para EEB.

O anticorpo monoclonal F89/160.1.5 utilizado na técnica foi selecionado por se ligar a um epítipo preservado em 15 das 16 sequências genéticas de PrP de ovinos, em um sítio polimórfico de 771 pares de bases de DNA do alelo 143RQ, identificado a partir de um ovino

mestiço Dorset (número de acesso junto ao GenBank: AF180389) descrito por O'Rourke *et al.* (2000).

O anticorpo monoclonal F99/97.6.1, por sua vez, dispõe de um coquetel reagente proposto para reconhecer todos os alelos ovinos submetidos ao GenbBank, bem como os alelos PrP de bovinos, cervos, alces, martas, gatos domésticos, kudu, bisão, humanos e um número de primatas não humanos nas quais as encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET) ou acumulação de PrP^{Sc} ocorrem naturalmente. A única exceção é a Nyala (*Tragelaphus angasi*). Além disso, pelo menos um destes epitopos da sequência PrP é encontrado na maioria das espécies domésticas e não domésticas de ruminantes, carnívoros e de primatas não humanos, a partir de dados que estão disponíveis. A conservação dos epitopos reconhecidos por MAbs F89/160.1.5 e F99/97.6.1 deve tornar este reagente adequado para coquetel de imunoenaios em tecidos de mais espécies com ocorrência natural de EETs e na vigilância de outras espécies expostas a EETs em condições de campo ou em jardins zoológicos (O'ROURKE *et al.*, 1998a).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB)

Entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008 foram realizados exames de imuno-histoquímica e coloração de hematoxilina-eosina para diagnóstico de EETs em amostras de 5571 animais. No ano de 2005, iniciaram-se os trabalhos do SPV/UFRGS para as análises de imuno-histoquímica em tecido nervoso para diagnóstico de EETs e o órgão de eleição para a técnica foi o cérebro, especificamente a região do óbex.

No período de três anos foram realizados exames em 4829 bovinos e 1 exame na espécie bubalina divididos em 109 amostras de necropsia e 4721 amostras enviadas por terceiros, provenientes de outros laboratórios (Tabela 1). Todas as amostras de bovinos e a amostra do bubalino analisadas para EEB foram negativas.

O Brasil tem um dos maiores rebanhos de corte do mundo e as condições de saúde do rebanho podem ser consideradas razoáveis uma vez que no país o uso de hormônios é proibido e há campanhas de controle da aftosa, brucelose e tuberculose. O registro de ocorrência da EEB ou doença da vaca louca é inexistente, o que classifica o rebanho brasileiro como livre da doença. As criações são predominantemente extensivas e as pastagens garantem o ganho de peso suficiente para as atuais exigências de mercado. Os programas de rastreabilidade, pela infra-estrutura já instalada, podem ser úteis ao controle sanitário e às movimentações de animais entre as várias regiões dos diferentes estados do país. Assim, é absolutamente imprescindível que as autoridades competentes implementem medidas sanitárias adequadas, para evitar a introdução no país de animais e ou produtos de origem animal que possam carrear o agente etiológico da EEB.

No Reino Unido, o período médio de incubação para EEB é de cerca de cinco anos, mas por medida de segurança a maior parte dos bovinos foi sacrificada com idade entre dois e três anos idade sem manifestações clínicas da doença; as perdas financeiras diretas pelo sacrifício de mais de 160 mil bovinos na década de 1980 associadas às medidas de controle da doença e suporte aos prejuízos do mercado da carne foram enormes (PRUSINER, 1997). Dessa maneira, é extremamente importante que os países em desenvolvimento, principalmente os grandes exportadores de produtos agro-alimentares, estejam atentos à grande ênfase atual na segurança sanitária e nas exigências implementadas nesse sentido pelos grandes importadores e exportadores mundiais desse segmento, sob pena de mais uma vez serem impedidos dos benefícios do comércio internacional.

A EEB tem sido transmitida experimentalmente por inoculação intracerebral a várias espécies como suínos (DAWSON *et al.*, 1990), bovinos, ovinos e caprinos (FOSTER *et al.*, 1993), camundongos (FRASER *et al.*, 1992; BRUCE *et al.*, 1994), marmota (BAKER *et al.*, 1993), marta (ROBINSON *et al.*, 1994) e macacos (LASMÉZAS *et al.*, 1996). Porém, tentativas de transmissão de EEB utilizando tecidos não neurais de bovinos naturalmente afetados pela doença, incluindo baço, até agora não tiveram êxito. Essas características podem ser utilizadas para identificar a estirpe do agente da EEB em transmissões para outras espécies, por exemplo, o gato doméstico (FRASER *et al.*, 1992; BRUCE *et al.*, 1994).

4.2 Scrapie

Entre 2005 e 2008, foram processadas amostras de 708 ovinos e 33 caprinos para histopatologia, coloração por hematoxilina e eosina e exame de imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie. As mostras analisadas correspondem a necropsias de 56 ovinos e 11 caprinos, biopsias de 395 ovinos, realizadas entre 2006 e 2008 (em 2005 não foram realizadas biopsias em ovinos), além de amostras enviadas por terceiros ou provenientes de outros laboratórios provenientes de 257 ovinos e 22 caprinos (Tabela 1).

TABELA 1. Análises de imuno-histoquímica e coloração de hematoxilina-eosina para diagnóstico de EEB e scrapie realizadas entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008.

Espécie	Necropsias n	Biopsias n	Amostras de terceiros n	TOTAL n
Bovina	108	-	4721	4829
Bubalina	1	-	-	1
Ovina	56	395	257	708
Caprina	11	-	22	33
TOTAL	176	395	5000	5571

A análise imuno-histoquímica para scrapie em órgãos linfóides seguiu os procedimentos descritos por O'Rourke *et al.* (2002) e Espenes *et al.* (2006). A avaliação histológica das reações imuno-histoquímicas se torna mais fácil quando se coleta um número suficientes de folículos linfóides de cada animal, o que equivale a um total de quatro a seis

foliculos por amostra processada. Dessa maneira, amostras com um número insuficiente de foliculos e com marcação positiva foram diagnosticadas como suspeitas e amostras com um número insuficiente de foliculos e marcação negativa foram consideradas insuficientes. Animais que tiveram amostras de órgãos como baço, intestino e linfonodo que mostraram marcação positiva, juntamente com órgãos como tonsila, terceira pálpebra e biopsia de mucosa retal sem a marcação positiva, foram considerados suspeitos. Esse critério foi estabelecido em função da considerável rotina do SPV/UFRGS no diagnóstico de EETs por imuno-histoquímica em órgãos como tonsila, terceira pálpebra e biopsia da mucosa retal. Dessa maneira, buscou-se evitar a possibilidade de diagnósticos falsos positivos. A repetição da análise imuno-histoquímica foi realizadas em todas as amostras de animais que apresentaram resultados positivos ou suspeitos (Figura 1).

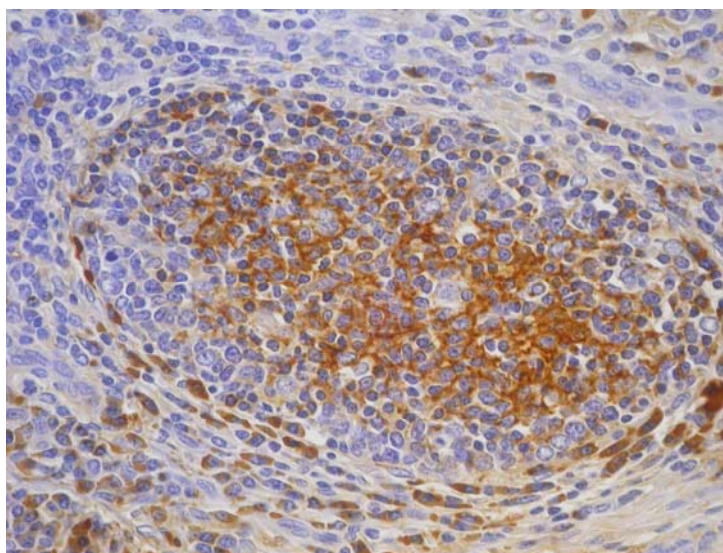


FIGURA 1. Preparação de imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie, em corte histológico da tonsila palatina de ovino da raça Santa Inês, 400X. Foliculo linfóide com intensa marcação positiva para PrP^{Sc} no centro germinativo.

Os resultados obtidos nas biopsias de ovinos representam os locais de eleição para as análises de scrapie. Entre 2006 e 2008, foi registrada a ocorrência de 24 animais positivos entre os 395 examinados (6,08%), nos quais os resultados positivos se concentram exclusivamente em foliculos da terceira pálpebra (Tabela 2). Os resultados referentes ao acúmulo de príon em tecidos linfóides também atingem outras categorias analisadas.

O material de ovinos e caprinos enviado por terceiros ao SPV/UFRGS durante o período 2006-2008 representou 5,58% (279/5000) das análises realizadas. Foram encontrados 37 animais positivos entre os 279 (13,26%) materiais enviados por terceiros e provenientes de

outros laboratórios (Tabela 2). Entre esses casos positivos, 18 animais apresentaram depósito de PrP^{Sc} somente na tonsila e outros 14 animais mostraram marcação positiva na tonsila associada com a marcação em outros órgãos como baço (3 animais), intestino (2 animais), terceira pálpebra (3 animais), linfonodos (3 animais) ou marcação positiva na tonsila, terceira pálpebra e linfonodos (3 animais). Outros animais apresentaram marcação positiva apenas na terceira pálpebra (3 animais), ou na terceira pálpebra e linfonodo (1 animal), ou no baço e intestino (1 animal).

Do material enviado por terceiros, entre os 257 ovinos, 81,32% (n=209) eram da raça Suffolk; 7,78% (n=20) da raça Hampshire; 7,39% (n=19) da raça Santa Inês; 0,78% (n=2) da raça Texel; e 2,72% (n=7) eram mestiços ou de raça não informada pelo solicitante. Entre os 22 caprinos (7,89%; 22/279) examinados no ano de 2007, foi diagnosticado o primeiro caso positivo para esta espécie no Brasil, com marcação imuno-histoquímica nas tonsilas, terceira pálpebra e linfonodo. A marcação pela imuno-histoquímica em quatro ovinos da raça Santa Inês, todos com diagnóstico positivo nas tonsilas e linfonodos e um com depósito de PrP^{Sc} na terceira pálpebra, também surgem como primeiro diagnóstico da doença na raça no Brasil. Para confirmar os diagnósticos positivos de scrapie foram realizadas cinco repetições da imuno-histoquímica para cada amostra positiva para PrP^{Sc}.

TABELA 2. Análises de imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos, realizadas entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008.

Resultados	Necropsias n	Biopsias n	Amostras de terceiros n	TOTAL n
Positivos	20	24	37	81
Suspeitos	0	0	16	16
Negativos	47	299	198	544
Insuficientes	0	72	28	100
TOTAL	67	395	279	741

Os resultados obtidos nos exames de necropsia de ovinos e caprinos entre os anos de 2005 e 2008 representam 1,2% do total de análises (67/5571). Os ovinos representam 1% das

necropsias realizadas (56/5571), apresentando 20 casos positivos, número que equivale a 29,85% (20/67) das necropsias realizadas pelo SPV/UFRGS em caprinos e ovinos, e a 35,7% (20/56) das necropsias de ovinos realizadas no período. A obtenção de 2 animais positivos com sinais clínicos e marcação positiva para Prp^{Sc} no SNC (Figura 2), um no ano de 2006 e outro em 2008, demonstram a importância do diagnóstico clínico associado à análise *ante mortem* realizada através de biopsias de terceira pálpebra e mucosa retal.

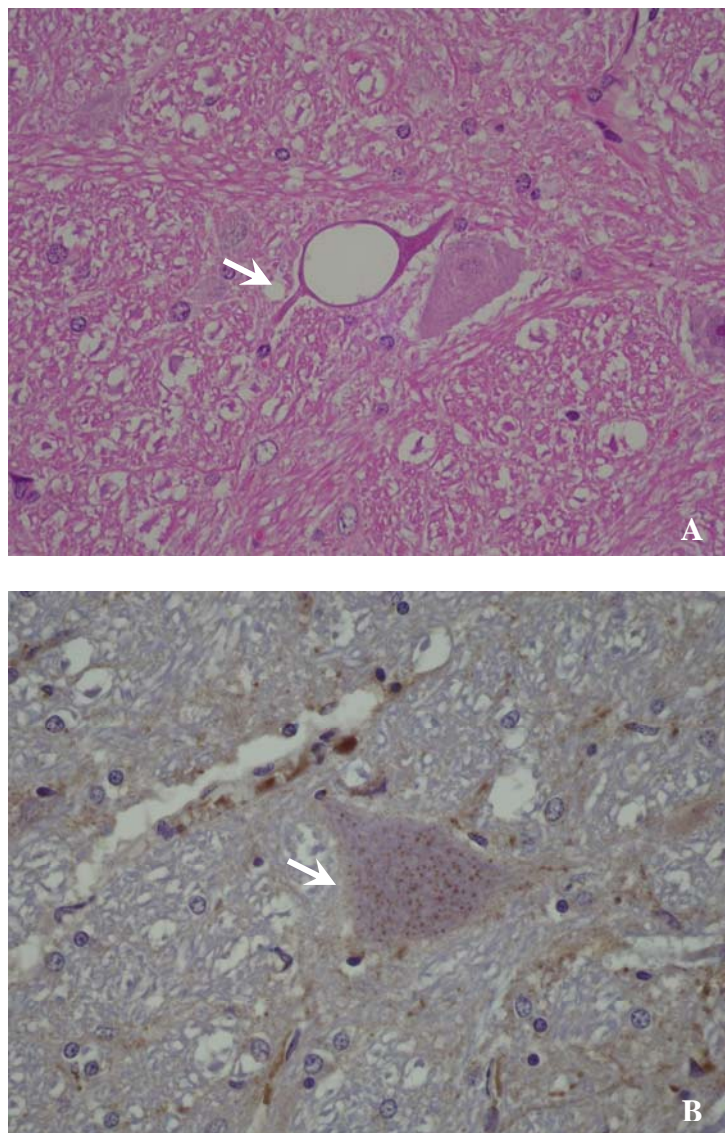


FIGURA 2. Corte histológico da região do tronco encefálico ovino na altura do óbex. A) Coloração hematoxilina e eosina, 400X. Intensa vacuolização da glia e, em destaque (seta), vacúolo intracelular causando distensão do pericário, produzindo um neurônio de aspecto balonoso. B) Preparação de imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie, 40X. Neurônio com marcação positiva para PrP^{Sc} (seta).

A detecção do PrP^{Sc} no cérebro é um adjunto importante para o diagnóstico histopatológico de scrapie e sua detecção no tecido linfóide é particularmente útil para a identificação precoce de ovinos afetados por scrapie durante a etapa pré-clínica da doença. As tonsilas palatíneas, tecido linfóide de terceira pálpebra e linfonodos retro-faríngeos acumulam quantidades de PrP^{Sc} detectáveis por imuno-histoquímica (SCHREUDER *et al.*, 1996; O'ROURKE *et al.*, 1998b; 2000) no início da infecção e são adequadas para biopsias ou exames *post mortem* de ovinos (O'ROURKE *et al.*, 2000; 2002). Os tecidos como tonsila e terceira pálpebra superior contêm um número maior de centros foliculares, assim devem ser órgãos de eleição em matadouros e avaliação de necropsia em ovinos sem sinais clínicos de scrapie, combinados com amostras de medula oblonga, ao nível do óbex. Os linfonodos retro-faríngeos podem ser coletados mais facilmente do que as tonsilas que são menores nos ovinos. A biopsia palpebral em ovinos vivos é facilmente coletada com instrumentos cirúrgicos depois da aplicação do anestésico tópico local; essas amostras são adequadas para o rastreamento de scrapie nos rebanhos (O'ROURKE *et al.*, 2000).

Testes para diagnóstico em tecido linfóide são factíveis para o subconjunto das EETs em que PrP^{Sc} se acumula nos gânglios linfáticos, principalmente no início do período de incubação, especialmente em ovinos com scrapie (VAN KEULEN *et al.*, 1996), na doença crônica dos cervídeos (SPRAKER *et al.*, 2002b) e na variante da doença de Creutzfeldt-Jakob (HILL *et al.*, 1997b). Em contrapartida, apesar da infectividade da porção distal do íleo de bovinos experimentalmente infectados com o agente EEB ter sido confirmada (WELLS *et al.*, 1998; TERRY *et al.*, 2003), a detecção do PrP^{Sc} por imunoensaio em tecidos linfóides periféricos não tem sido relatada. Estudos com scrapie ovino mostram acúmulo de PrP^{Sc} em tecidos do SNC, mas não necessariamente em tecidos linfóides (O'ROURKE *et al.*, 2000).

A existência e as implicações das formas subclínicas da doença priônica têm sido discutidas. Os dados de vários pesquisadores têm fornecido evidências para a existência de formas subclínicas de infecção por príon, nas quais os animais propagam e acumulam altos níveis de príons infecciosos, mas podem viver uma vida normal sem exibir sinais clínicos da doença (RACE & CHESEBRO, 1998; THACKRAY *et al.*, 2002). A compreensão da patogênese envolvida nestas condições neurodegenerativas em um nível molecular é crucial para desenvolver testes de diagnóstico precoce (HILL & COLLINGE; 2003). Portanto, os animais podem ter implicações infecciosas assintomáticas significativas com títulos de PrP^{Sc} no cérebro e outros tecidos. No entanto, as formas de infecção por príons podem ser subclínicas, mas são distintas das pré-clínicas, onde os animais se tornam portadores assintomáticos e não desenvolvem a doença clínica durante a vida normal (FRIGG *et al.*,

1999). Esses estados são bem reconhecidos em outras doenças infecciosas. No entanto, em doenças priônicas, onde os períodos de incubação são extremamente prolongados, a distinção entre pré-clínico e subclínico é mais difícil. Neste contexto, a distinção entre os termos sub e pré-clínico se tornam essencialmente uma questão de semântica (HILL & COLLINGE, 2003).

A existência de infecção subclínica por príon também deve incentivar a reflexão sobre a possibilidade de que outras espécies (como ovinos, suínos e aves), expostos a príons da EEB através de alimentos contaminados, podem ser capazes de desenvolver a forma subclínica. Dados de que a EEB é patogênica em uma grande variedade de espécies e que a estirpe característica da EEB é mantida após a transmissão para novas espécies, devem ser considerados. É possível, se não provável, que a EEB transmitida para outros animais que não os bovinos, mantenha a patogenicidade para os humanos. Um estudo demonstrou a presença do PrP^{Sc} em bovinos sem sintomas evidentes de EEB, usando um ensaio de *Western blotting* (SCHALLER *et al.*, 1999). Outro estudo que analisou regiões específicas do cérebro bovino através de imunoensaio também apresentou resultados positivos para PrP^{Sc} em um grupo de bovinos aparentemente saudáveis (SCHULZ-SCHAEFFER *et al.*, 2000). Resultados experimentais de casos subclínicos em animais com doenças priônicas demonstraram que altos níveis de príons infecciosos podem ser abrigados em seus cérebros, sem demonstrarem quaisquer sinais clínicos da doença, sugerindo que a infecção priônica, em oposição à doença, deve ser testada em bovinos aparentemente saudáveis após abate para investigar se níveis significativos de "EEB silencioso" (sub ou pré-clínico) estão presentes (HILL *et al.*, 1997a; LASMÉZAS *et al.*, 1997).

O valor do teste diagnóstico para scrapie dos ovinos baseado na detecção do PrP^{Sc} em tecidos linfóides depende, em parte, de um entendimento aprofundado sobre a patogenia da enfermidade, porém, incluindo os efeitos da consanguinidade, diferenças de raças e do envolvimento genético, a dose e via de infecção, a estirpe do agente no momento da ocorrência e o grau do envolvimento do tecido linfóide da terceira pálpebra, tonsilas, placas de Peyer e dos tecidos do SNC. Estudos de acumulação PrP^{Sc} na tonsila, terceira pálpebra (O'ROURKE *et al.*, 2000) e em vários tecidos linfóides em scrapie natural (VAN KEULEN *et al.*, 1996; ANDREOLETTI *et al.*, 2000; JEFFREY *et al.*, 2001) e experimental (ERSDAL *et al.*, 2005) demonstraram que a tonsila está entre os tecidos em que é encontrada PrP^{Sc} no início de infecção (ESPENES *et al.*, 2006). O teste de terceira pálpebra para PrP^{Sc} em ovinos vivos é uma prática facilmente padronizada em ensaios que são úteis para o diagnóstico da doença em programas de vigilância, durante a investigação e estudos para determinar a transmissão, epidemiologia e patogênese da ocorrência natural das EETs. O exame deve ser

realizado em uma amostra suficientemente grande para a determinação precisa da sensibilidade diagnóstica e especificidade do teste, como um teste para diagnóstico de scrapie em ovinos em andamento na União Européia (O'ROURKE *et al.*, 2000).

O aperfeiçoamento da utilização da terceira pálpebra como teste *ante mortem* para diagnóstico de scrapie e a identificação dos genótipos PrP^{Sc} de animais com a doença subclínica e clínica associada com acúmulo PrP^{Sc}, disponibilizaram meios adicionais para controlar a doença em populações ovinas na União Européia. A estimativa da especificidade do teste de terceira pálpebra é de 100% e a sensibilidade estimada do teste é de 85 a 90% (O'ROURKE *et al.*, 2000). Os resultados falso-negativos são devidos a inúmeros fatores. Alguns ovinos infectados têm PrP^{Sc} detectável no cérebro, mas não em tecidos linfóides; em outros casos, PrP^{Sc} é detectável na tonsila, mas não em biopsia palpebral, em parte devido ao tamanho inadequado da amostra. A manipulação do tecido em laboratório para maximizar o número de folículos disponíveis, possibilitando que uma única seção de inspeção histológica permita reconhecer o lado do tecido linfóide incorporado a uma amostra plana, no plano de corte do micrótomo, exige laboratório adequadamente equipado e pessoal treinado (O'ROURKE *et al.*, 2002).

A análise imuno-histoquímica em tecidos de mucosa retal no ano de 2007 mostrou resultado negativo para a presença de príon neste tecido. Entre os 741 ovinos e caprinos pesquisados (Tabela 2), apenas 379 amostras de mucosa retal foram analisadas, das quais 92,35% (350/379) foram negativas e 7,65% (29/379) apresentaram material insuficiente para diagnóstico, não sendo observado nenhum resultado positivo neste tecido (Tabela 3). Entretanto, apesar de que todas as amostras de mucosa foram negativas, a biopsia retal é considerada uma grande ferramenta para o diagnóstico precoce *ante mortem* de scrapie (GONZÁLEZ *et al.*, 2005; 2006). O interesse principal da mucosa retal como amostra para diagnóstico de scrapie não é para exames *post mortem*, em necropsia. O tecido linfóide retal é facilmente acessível em ovinos vivos, facilitando a rápida coleta da amostra com o mínimo de desconforto. A limitação de métodos como o *Western blotting* e ELISA, que são as técnicas mais comumente utilizadas em programas de vigilância de scrapie e EEB na Europa e Estados Unidos, é que uma pequena amostra contendo folículos reduz a probabilidade de se obter quantidades detectáveis de PrP^{Sc} e aumenta a probabilidade de resultados falsos negativos. Neste aspecto, os testes baseados em imuno-histoquímica podem ser mais sensíveis e mais fáceis de interpretar, pois a presença de folículos pode ser facilmente avaliada (ESPENES *et al.*, 2006).

TABELA 3. Órgãos submetidos a análises de imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos, realizadas entre janeiro de 2005 e janeiro de 2008.

Órgão	Positivo n	Suspeito n	Insuficiente n	Negativo n	TOTAL n
Baço	9	2	0	85	96
Tonsila	50	0	45	171	266
Cerebelo	1	0	0	3	4
Óbex	2	0	0	168	170
3ª. Pálpebra	44	0	127	384	555
Linfonodo	12	5	1	117	135
Mucosa retal	0	0	29	350	379
Intestino	13	0	0	111	124
TOTAL	131	7	202	1389	1729

Talvez, o procedimento de coleta das amostras da mucosa retal realizada no presente trabalho tenha sido pouco eficiente para permitir o diagnóstico de scrapie pela análise imuno-histoquímica. Aleksandersen *et al.* (1991) relataram a localização agregada dos folículos linfóides entre pregas longitudinais, na mucosa retal. Amostras de biópsia que possam evitar dobras da mucosa reduzem significativamente a probabilidade de resultados falsos negativos. Este ponto é muito importante, pois a coleta adequada e em quantidade suficiente é limitante para o método. Materiais coletados de forma inadequada geram amostras insuficientes para diagnóstico. O problema do diagnóstico precoce de EETs em animais vivos e os mecanismos responsáveis pela disseminação de príons para o ambiente são questões pendentes em ovinos e outras espécies. Até agora, esforços para diagnosticar EETs durante o período pré-clínico ou fases iniciais da doença clínica podem se basear na detecção do PrP^{Sc} em tecidos periféricos acessíveis através do uso de anestésicos ou analgésicos (ESPENES *et al.*, 2006). A biópsia retal oferece a possibilidade de obter material mais facilmente, porém as perspectivas para o diagnóstico pré-clínico ainda são confundidas pelo problema de que, em muitas EETs, existe pouco ou nenhum PrP^{Sc} presente em locais periféricos. A identificação do agente para o desenvolvimento de uma detecção mais sensível de ensaios anti-PrP^{Sc}

melhoraria grandemente as perspectivas do pré-diagnóstico das EETs, principalmente o scrapie. Neste aspecto, a melhora no diagnóstico pelo auxílio da biopsia da mucosa retal, bem como outros órgãos linfóides está intimamente ligada à prática em coleta e realização das técnicas de diagnóstico.

Estudos sobre a patogênese da scrapie natural em ovinos (HADLOW *et al.*, 1982) e caprinos (HADLOW *et al.*, 1980) têm demonstrado que infecciosidade está presente no baço de ovinos na fase pré-clínica da doença e no baço de animais clinicamente afetados de ambas as espécies. Isso também é válido para caprinos e ovinos após a infecção experimental com scrapie (STAMP *et al.*, 1959; PATTISON & MILLSON, 1960; HADLOW *et al.*, 1974).

Outro ponto importante são as amostras ovinos e caprinos oriundas de biopsias, materiais enviados por terceiros e outros laboratórios classificadas como insuficientes para diagnóstico. Entre as amostras examinadas de 617 animais (material de 166 animais enviado por terceiros em 2006 e biopsias e materiais de 451 animais enviados por terceiros em 2007), biopsias de 72 (11,67%) e materiais enviados por terceiros de 28 (4,54%), foram consideradas insuficientes para a definição do diagnóstico de scrapie. Esta percentagem de material classificado como insuficiente ocorre porque o tecido linfóide não é homogêneo na distribuição de PrP^{Sc}, principalmente em animais jovens. Segundo Grassi *et al.* (2001), para o diagnóstico por imuno-histoquímica os materiais devem ter, no mínimo, quatro folículos linfóides, com centros germinativos.

Esse número de animais sem diagnóstico por insuficiência de material (100/617) expressa a ausência de órgãos importantes como terceira pálpebra e cérebro, em muitas das amostras. A falha na coleta de partes importantes de órgãos como as tonsilas, a terceira pálpebra e mucosa retal, com a coleta de folículos insuficientes, é o ponto principal para a falha nesses diagnósticos. Paralelamente, a definição de um diagnóstico positivo com a existência de apenas um órgão com marcação positiva para scrapie, como o baço ou intestino, poderia gerar controvérsias. Apesar da existência de relatos de contaminação natural e experimental por scrapie iniciando por contato oral e a presença de príons no baço e placas de Peyer, esses diagnósticos apenas comprovam a existência de scrapie e não garantem o desenvolvimento do quadro clínico da doença. A existência de EEB em órgãos linfóides também é relatada (WELLS *et al.*: 1998, TERRY *et al.*: 2003).

De maneira semelhante, em 2006, em 16 ovinos da raça Suffolk houve a necessidade de revisão nos diagnósticos em função da presença de marcações apenas em órgãos como o baço (seis animais) ou intestino (10 animais), sendo diagnosticados como suspeitos. A marcação exclusiva e única em um desses órgãos representa um risco de diagnóstico,

possibilitando a obtenção de falsos positivos. Isso é mais bem interpretado pelo fato do baço apresentar um aporte sanguíneo maior, gerando uma discussão pelo aumento do *background*. Quanto às marcações no intestino, a presença de 13 animais com marcação positiva nesse órgão não garante a confirmação do diagnóstico. Desses 13 animais, somente três se confirmaram positivos, pelo fato de apresentarem marcações positivas também no baço, tonsila e terceira pálpebra. Dessa maneira, os materiais que apresentaram marcação positiva somente em órgãos como baço, intestino ou linfonodo, foram classificados como suspeitos, em virtude da grande dificuldade de apresentação do diagnóstico positivo confirmatório nos órgãos-alvo.

Os resultados considerados como suspeitos ou as amostras insuficientes observados nas amostras coletadas por biopsia ou enviadas por terceiros indicam que alguns aspectos associados com coleta das amostras necessitam ajustes. O envio de material de vários órgãos linfóides possibilitaria a confirmação da presença ou não do agente em pelo menos dois, permitindo o diagnóstico positivo ou negativo, diminuindo o número de casos considerados suspeitos e o risco de falsos positivos. No caso de amostras de biopsia, o envio de material da tonsila, terceira pálpebra e mucosa retal, em conjunto, reduziria não só o número de casos suspeitos, mas também eliminaria grande parte, senão a totalidade dos casos considerados insuficientes para o diagnóstico. A confirmação dos diagnósticos positivos e negativos será ampliada, à medida que a técnica de diagnóstico seja executada com maior frequência e as orientações de coleta do material sejam aprimoradas, uma vez que o envio de material continua ocorrendo.

5 CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados observados neste trabalho, pode-se concluir que:

- a otimização da técnica de imuno-histoquímica realizada foi eficiente para o diagnóstico de príon PrP^{Sc} em tecido nervoso de ovinos e caprinos;

- a não detecção de PrP^{Sc} em bovinos corrobora com a manutenção do diagnóstico da inexistência de encefalopatia espongiforme bovina (EEB) no Brasil;

- a utilização de tecido linforreticular é viável para o diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos;

- a utilização das técnicas de biopsia para diagnóstico de scrapie em tecidos de terceira pálpebra e mucosa retal é possível, desde que sejam realizados ajustes para melhorar a representatividade da amostra coletada;

- a intensificação da realização de biopsia para diagnóstico de proteína priônica, bem como a utilização de outros órgãos linfóides, como as tonsilas, em exames pré-clínicos, se faz necessária para a melhoria na viabilidade e eficiência das técnicas de coleta e diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIN, C.; MARTIN-BURRIEL, I.; GOLDMANN, W.; LYAHYAI, J.; MONZÓN, M.; BOLEA, R.; SMITH, A.; RODELLAR, C.; BADIOLA, J. J.; ZARAGOZA, P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie affected Spanish sheep. **Journal of General Virology**, v.85, p.2103-2110, 2004.
- ALEKSANDERSEN, M.; NICANDER, L.; LANDSVERK, T. Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid follicles in the large intestine of sheep. **Developmental and Comparative Immunology**, v.15, p.413-422, 1991.
- ALETHÉIA, L.B.C. **Caracterização do gene PrP em ovinos da raça Santa Inês**. 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- ANDREOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; VAN KEULEN, L.; SCHELCHER, F.; ELSEN, J-M.; LANTIER, F. 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.
- BAKER, H.F.; RIDLEY, R.M.; WELLS, G.A.H. Experimental transmission of BSE and Scrapie to common marmoset. **Veterinary Record**, v.132, p. 403-406, 1993.
- BARON, T. G. M.; MADEC, J-Y.; CALAVAS, D.; RICHARD, Y.; BARILLET, F. Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. **Neuroscience Letters**, v.284, p.175-178, 2000.
- BARROS, C.S.L.; MARQUES, G.H.F. **Procedimentos para o diagnóstico das doenças do sistema nervoso central de bovinos**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. 50 p.
- BARRY, R.A.; PRUSINER, S.B. Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. **Infectious Diseases**, v.154, p.518-521, 1986.
- BELLWORTHY, S.J.; HAWKINS, S.A.; GREEN, R.B.; BLAMIRE, I.; DEXTER, G.; DEXTER, I.; LOCKEY, R.; JEFFREY, M.; RYDER, S.; BERTHELIN-BAKER, C.; SIMMONS, M.M. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to onset of clinical disease after oral challenge. **Veterinary Record**, v.156, p.197-202, 2005.
- BELT, P.B.G.M.; MUILEMAN, I. H.; SCHREUDER, B.E.C.; BOS-DE RUIJTER, J.; GIELKINS, A.L.J.; SMITS, M.A. 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.
- BERG, L.J. Insights into the role of the immune system in prion diseases. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.91, p.429-432, 1994.
- BESSEN, R. A.; MARSH, R. F. Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. **Journal of General Virology**, v.73, p.329-334, 1992.

BOLTON, D.C.; MEYER, R.K.; PRUSINER, S.B. Scrapie PrP 27-30 is a sialolycoprotein. **Journal of Virology**, v.53, p.596-60, 1985.

BORCHELT, D.R.; SCOTT, M.; TARABOULOS, A.; STAHL, N.; PRUSINER, S. B. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. **Journal of Cell Biology**, v.110, n.3, p.743-752, 1990.

BOSSERS, A.; SCHREUDER, B.E.C.; MUILEMAN, I.H.; BELT, P.B.G.M.; SMITS, M.A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. **Journal of General Virology**, v.77, p.2669-2673, 1996.

BOSSERS, A.; BELT, P.B.G.M.; RAYMOND, G. J.; CAUGHEY, B.; DE VRIES, R.; SMITS, M.A. Scrapie susceptibility linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.94, p.4931-4936, 1997.

BOSSERS, A.; DE VRIES, R.; SMITS, M.A. Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. **Journal of Virology**, v.74, n.3 p.1407-1414, 2000.

BRADLEY, R. Embryo transfer and its potential role in control of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. **Livestock Production Science**, v.38, n.1, p.51-59, 2001.

BRANDER, S.; ISENMANN, S.; RAEBER, A.; FISCHER, M.; SAILER, A.; KOBAYASI, Y.; MARINO, S.; WEISSMANN, C.; Aguzzi, A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. **Nature**, v.379, p.339-343, 1996.

BRAUN, U.; SCHICKER, E.; HOMLIMANN, B. Diagnostic reliability of clinical signs in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.143, p.101-105, 1998.

BROTHERSTON, J.G.; RENWICK, C.C.; STAMP, J.T.; ZLOTNIK, I.; PATTISON, I.H. Spread of scrapie by contact to goats and sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.78, p.9-17, 1968.

BROWN, P.; LIBERSKI, P.P.; WOLFF, A.; GAJDUSEK, D. C. Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. **Journal of Infectious Diseases**, v.161, n.3, p.467-472, 1990.

BRUCE, M. E.; DICKINSON, A. G. Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. **Journal of General Virology**, v.68, p.79-89, 1987.

BRUCE, M. E.; MCCONNELL, I.; FRASER, H.; DICKINSON, A.G. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. **Journal of General Virology**, v.72, p.595-603, 1991.

BRUCE, M.E.; CHREE, A.; MCCONNELL, I.; FOSTER, J.; PEARSON, G.; FRASER, H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** v.343, n.1306, p. 405-411, 1994.

BRUCE, M.E.; WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; MCCONNELL, I.; DRUMMOND, D.; SUTTIE, A.; MCCARDLE, L.; CHREE, A.; HOPE, J.; BIRKETT, C.; COUSENS, S.; FRASER, H.; BOSTOCK, C.J. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. **Nature**, v.389, p. 498-501, 1997.

BUELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUST, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, v.73, p.1339-1347, 1993.

BURNS, C.S.; ARONOFF-SPENCER, E.; LEGNAME, G.; PRUSINER, S.B.; ANTHOLINE, W.E.; GERFEN, G.J.; PEISACH, J.; MILLHAUSER, G.L. Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. **Biochemistry**, v.42, p.6794-6803, 2003.

CAPELLARI, S.; ZAIDI, S.I.A.; URIG, C.B.; PERRY, G.; SMITH, M. A.; PETERSEN, R.B. Prion protein glycosylation is sensitive to redox change. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.49, p.34846-34850, 1999.

CARAMELLI, M.; RU, G.; CASALONE, C.; BOZZETTA, E.; ACUTIS, P.L.; CALELLA, A.; FORLONI, G. Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. **Veterinary Record**, v.148, p.531-536, 2001.

CASTIGLIONI, B.; COMINCINI, S.; DRISALDI, B.; MOTTA, T.; FERRETTI, L. Comparative mapping of the prion gene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR generated probes. **Mammary Genome**, v.9, p.853-855, 1998.

CAUGHEY, B.; RAYMOND, G. J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. **Journal Biological Chemistry**, v.266, n.27, p.18217-18223, 1991.

CHAPLIN, M.J.; BARLOW, N.; RYDER, S.; SIMMONS, M.M.; SPENCER, Y.; HUGHES, R.; STACK, M.J. Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrP^{Sc} by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE. **Research in Veterinary Science**, v.72, p.37-43, 2002.

COCKCROFT, P.D. Pattern-matching models for the differential diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.144, p.607-610, 1999.

CORONA, C.; CASALONE, C.; ACUTIS, P.L.; CRESCIO, M.I.; MARTUCCI, F.; IULINI, B.; FLORIO, C.L.; GAZZUOLA, P.; PERFETTI, G.; BONA, C.; RU, G.; CARAMELLI, M. Detection of pathological prion protein in the tongue of sheep infected with naturally occurring scrapie. **Veterinary Research Communications**, v.30, suppl. 1, p.239-240, 2006.

DAGGETT, V. Structure-function aspects of prion proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v.9, p.359-365, 1998.

DAWSON, M.; HOINVILLE L. J.; HOSSIE B. D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as aid to the control of clinical scrapie. **Veterinary Record** v.142, n. 23 p.623-625, 1998.

DAWSON, M.; WELLS, G.A.; PARKER, B.N.; SCOTT, A.C. Primary parental transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. **Veterinary Record**, v.127, n.13, p.338-341, 1990.

DEBEER, S.O.S., BARON, T.G.M.; BENCSIK, A.A. Immunohistochemistry of PrP^{Sc} within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. **J. Histochem. Cytochem.**, v.49, p.1519-1524, 2001.

DETWILER, L.A.; RUBENSTEIN, R. Bovine Spongiform Encephalopathy. **ASAIO Journal**, v. 6, n. 46, p,73-79, 2000.

DICKINSON, A. G.; MEIKLE, V. M. A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. **Genetic Research**, v.13, n.2, p.213-225, 1969.

DICKINSON, A.G.; YOUNG, G.B.; STAMP, J.T.; RENWICK, C.C. An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. **Heredity**, v.20, n.4, p.485-503, 1965.

DICKINSON, A.G.; MEIKLE, V.M.H.; FRASER, H. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. **Journal of Comparative Pathology**, v.78, n.3, p.293-299, 1968a.

DICKINSON, A.G.; STAMP, J.T.; RENWICK, C.C.; RENNIE, J.C. Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. **Journal of Comparative Pathology**, v.78, p.313-321, 1968b.

DICKINSON, A.G.; STAMP, J.T.; RENWICK, C.C. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.84, p.19-25, 1974.

DOBSON, C.M. Protein misfolding, evolution and disease. **Trends in Biochemical Science**, v.24, p.329-332, 1999.

DONNE, D.G.; VILES, J.H.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; JAMES, T.L.; COHEN, F.E.; PRUSINER, S.B.; WRIGHT, P.E.; DYSON, H.J. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.94, p.13452-13457, 1997.

ERSDAL, C.; ULVUND, M. J.; ESPENES, A.; BENESTAD, S. L.; SARRADIN, P.; LANDSVERK, T. Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. **Veterinary Pathology**, v.42, p. 258-274, 2005.

ESPENES, A.; PRESS, C. McL.; LANDSVERK, T.; TRANULIS, M.A.; ALEKSANDERSEN, M.; GUNNES, G.; BENESTAD, S.L.; FUGLESTVEIT, R.; ULVUND, M.J. 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.

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

FOOTE, W.C.; CLARK, W.; MACIULIS, A.; CALL, J.W.; HOURRIGAN, J.; EVANS, R.C.; MARSHALL, M.R.; DE CAMP, M. Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. **American Journal Veterinary Research** , v.54, n.11, p.1863-1868, 1993.

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

FOSTER, J.D.; WILSON, M.; HUNTER, N. Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. **Veterinary Record**, v.139, p.512-515, 1996.

FOSTER, J.D.; PARNHAM, D.; CHONG, A.; GOLDMANN, W.; HUNTER, N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. **Veterinary Record**, v.148, p.165-171, 2001.

FOSTER, J.D.; MCKENZIE, C.; PARNHAM, D. Lateral transmission of natural scrapie to scrapie-free New Zealand sheep placed in an endemically infected UK flock. **Veterinary Record**, v.159, p.633-634, 2006.

FRANSCINI, N.; GEDAILY, A.E.; MATTHEY, U.; FRANITZA, S.; SY, M.S.; BÜRKLE, A.; GROSCHUP, M.; BRAUN, U.; ZAHN, R. Prion protein in milk. **PLoS ONE**, v.1, p. e71(1-5), 2006.

FRASER, H.; BRUCE, M.E.; CHREE, A.; McCONNELL, I.; WELLS, G.A. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. **Journal of General Virology**, v.73, p.1891-1897, 1992.

FRIGG, R.; KLEIN, M.A.; HEGYI, I.; ZINKERNAGEL, R.M.; AGUZZI, A. Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. **Journal of Virology**, v.73, n.11, p.9584-9588, 1999.

GARNETT, A.P.; VILES, J.H. Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insight from circular dichroism. **Journal Biological Chemistry**, v.278, p.6795-6802, 2003.

GASSET, M.; BALDWIN, M.A.; LLOYD, D.H.; GABRIEL, J.M.; HOLTZMAN, D.M.; COHEN, F.; FLETTERICK, R.; PRUSINER, S.B. Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. **Proceedings of the National Academy of Science U S A.**, v.89, n.22, p.10940-10944, 1992.

GAVIER-WIDEN, D.; STACK, M.J.; BARON, T.; BALACHANDRAN, A.; SIMMONS, M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, n.6, p.509-527, 2005.

GODON, K.A.H.; HONSTEAD, J. Transmissible spongiform encephalopathies in food animals. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.14, n.1, p.49-70, 1999.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; BENSON, G.; FOSTER, J.D.; HOPE, J. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. **Journal of General Virology**, v.72, p.2411-2417, 1991.

GOLDMANN, W.; HUNTER, N.; SMITH, G.; FOSTER, J.; HOPE, J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. **Journal of General Virology**, v.75, p.989-995, 1994.

GONZÁLEZ, L.; JEFFREY, M.; SISÓ, S.; MARTIN, S.; BELLWORTHY, S. J.; STACK, M.; CHAPLIN, M.; DAVIS, L.; DAGLEISH, M. P.; REID, H. W. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. **Veterinary Record**, v.156, p.846-847, 2005.

GONZÁLEZ, L.; DAGLEISH, M.P.; BELLWORTHY, S.J.; SISÓ, S.; STACK, M.J.; CHAPLIN, M.J.; DAVIS, L.A.; HAWKINS, S.A.C.; HUGHES, J.; JEFFREY, M. Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. **Veterinary Record**, v.158, p.325-331, 2006.

GOSSERT, A.D.; BONJOUR, S.; LYSEK, D.A.; FIORITO, F.; WUTHRICH K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.102, p.646-650, 2005.

GRASSI, J. Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.10, p. 19-22, 2003.

GRASSI, J.; COMOY, E.; SIMON, S.; CRÉMINON, C.; FROBERT, Y.; TRAPMANN, S.; SCHIMMEL, H.; HAWKINS, S.A.; MOYNAGH, J.; DESLYS, J.P.; WELLS, G.A. Rapid tests for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. **Veterinary Record**, v.149, p.577-582, 2001.

GRESHAM, A. Scrapie transmission via milk. **Veterinary Record**, v. 162, n.16, p.525-526, 2008.

HADLOW, W.J.; EKLUND, C.M.; KENNEDY, R.C.; JACKSON, T.A.; WHITFORD, H.W.; BOYLE, C.C. Course of experimental scrapie virus infection in the goat. **Journal of Infectious Diseases**, v.129, p.559-567, 1974.

HADLOW, W.J.; KENNEDY, R.C.; RACE, R.E.; EKLUND, C.M. Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. **Veterinary Pathology**, v.17, p.187-199, 1980.

HADLOW, W.J.; KENNEDY, R.C.; RACE, R.E. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. **Journal of Infectious Diseases**, v.146, p.657-664, 1982.

HIBLER, C.P.; WILSON, K.L.; SPRAKER, T.R.; MILLER, M.W.; ZINK, R.R.; DEBUSE, L.L.; ANDERSEN, E.; SCHWEITZER, D.; KENNEDY, J.A.; BAETEN, L.A.; SMELTZER, J.F.; SALMAN, M.D.; POWERS, B.E. Field validation and assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting chronic wasting disease in mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, p.311-319, 2003.

HILL, A.F.; COLLINGE, J. Subclinical prion infection. **TRENDS in Microbiology**, v.11, n.12, p. 578-584, 2003.

HILL, A.F.; DESBRUSLAIS, M.; JOINER, S.; SIDLE, K.C.L.; GOWLAND, I.; COLLINGE, J.; DOEY, L.J.; LANTOS, P. The same prion strain causes vCJD and BSE. **Nature**, v.389, p.448-450, 1997a.

HILL, A.F.; ZEIDLER, M.; IRONSIDE, J.; COLLINGE, J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. **Lancet**, v.349, p.99-100, 1997b.

HOINVILLE, L. J. Clinical signs of reported cases of BSE and their analysis to aid in diagnosis. **Cattle Practice**, v.1, p.59-61, 1993.

HOUSTON, E. F.; GRAVENOR, M. B. Clinical signs in sheep experimentally infected with

scrapie and BSE. **Veterinary Record**, v.152, p.333-334, 2003.

HUANG, Z.; GABRIEL, J.M.; BALDWIN, M.A.; FLETTERICK, R.J.; PRUSINER, S.B.; COHEN, F.E. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.91, p.7139-7143, 1994.

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

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; HOPE, J. Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. **Veterinary Record** v.130, p.389-382, 1992.

HUNTER, N.; GOLDMANN, W.; BENSON, G.; FOSTER, J. D.; HOPE, J. Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. **Journal of General Virology**, v.74, p.1025-1031, 1993.

HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; GOLDMANN, W.; STEAR, M.J.; HOPE, J.; BOSTOCK, C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. **Archives of Virology**, v.141, p.809-824, 1996.

HUNTER, N.; FOSTER, J.; CHONG, A.; McCUTCHEON, S.; PARNHAM, D.; EATON, S.; MACKENZIE, C.; HOUSTON, F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. **Journal of General Virology**, v.83, p.2897-2905, 2002.

IKEGAMI, Y.; ITO, M.; ISOMURA, H.; MOMOTANI, E.; SASAKI, K.; MURAMATSU, Y.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. **Veterinary Record**, v.128, p.271-275, 1991.

JEFFREY, M.; GONZALEZ, L. Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.284, p.65-97, 2004.

JEFFREY, M.; MARTIN, S.; THOMSON, J.R.; DINGWALL, W.S.; BEGARAMCGORUM, I.; GONZÁLEZ, L. 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.

KIMBERLIN, R.H. Transmissible encephalopathies in animals. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p. 30-37, 1990.

KIMBERLIN, R.H.; WALKER, C.A.; MILLSON, G.C.; TAYLOR, D.M.; ROBERTSON, P.A.; TOMLINSON, A. H.; DICKINSON, A. G. Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. **Journal of Neurological Sciences**, v.59, p.355-369, 1983.

KIMURA, K.; HARITANI, M. Distribution of accumulated prion protein in a cow with bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.162, p.822-825, 2008.

KONOLD, T.; MOORE, S. J.; BELLWORTHY, S. J.; SIMMONS, H.A. Evidence of scrapie transmission via milk. **BMC Veterinary Research**, v.4, p.14, 2008.

KORTH, C.; STIERLI, B.; STREIT, P.; MOSER, M.; SCHALLER, O.; FISCHER, R.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; KRETZSCHMAR, H.; RAEBER, A.; BRAUN, U.; EHRENSPERGER, F.; HORNEMANN, S.; GLOCKSHUBER, R.; RIEK, R.; BILLETER, M.; WÜTHRICH, K.; OESCH, B. Prion (PrpSc)-specific epitope defined by a monoclonal-antibody. **Nature**, v.390, p.74-77, 1997.

LASMÉZAS, C.I.; DESLYS, J.P.; DEMAIMAY, R.; ADJOU, K.T.; LAMOURY, F.; DORMONT, D.; ROBAIN, O.; IRONSIDE, J.; HAUW, J.J. BSE transmission to macaques. **Nature**, v. 381, p. 743-744, 1996.

LASMÉZAS, C.I.; DESLYS, J.P.; ROBAIN, O.; JAEGLY, A.; BERINGUE, V.; PEYRIN, J.M.; FOURNIER, J.G.; HAUW, J.J.; ROSSIER, J.; DORMONT, D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. **Science**, v.275, p.402-405, 1997.

LEE, I.Y.; WESTAWAY, D.; SMIT, A.F.A.; WANG, K.; SETO, J.; CHEN, L.; ACHARYA, C.; ANKENER, M.; BASKIN, D.; COOPER, C.; YAO, H.; PRUSINER, S.B.; HOOD, L.E. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genome Research**. v.8. n.10, p.1022-1037, 1998

LOPEZ-GARCIA, F.; ZAHN, R.; RIEK, R.; WUTHRICH, K. NMR structure of the bovine prion protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.97, p.8334-8339, 2000.

LYSEK, D.A.; SCHORN, C.; NIVON, L.G.; ESTEVE-MOYA, V.; CHRISTEN, B.; CALZOLAI, L.; VON SCHROETTER, C.; FIORITO, F.; HERRMANN, T.; GÜNTERT, P.; WÜTHRICH, K. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.102, n.3, p.640-645, 2005.

MADEC, J-Y.; BELLI, R., CALAVAS, D.; BARON, T.H. Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. **Veterinary Record**, v.146, p.74-76, 2000.

MANUELIDIS L. Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease and other transmissible agents. **Journal of Neurovirology**, v.3, p. 62-65, 1997.

McELROY, M. C.; WEAVERS, E. D. Clinical presentation of bovine spongiform encephalopathy in the Republic of Ireland. **Veterinary Record**, v.149,p.747-748, 2001.

McKINLEY, M. P.; BOLTON, D. C.; PRUSINER, S. B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. **Cell**, v.35, n.1, p.57-62, 1983.

MIHARA, H.; TAKAHASHI, Y. Engineering peptides and proteins that undergo α -to- β transitions. **Current Opinion in Structural Biology**, v.7, p.501-508, 1997.

MILLSON, G.C.; HUNTER, G.D.; KIMBERLIN, R.H. An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures. II. The association of scrapie activity with membrane fractions. **Journal of Comparative Pathology**, v.81, p.255-265, 1997.

MOUDJOU, M. FROBERT, Y.; GRASSI, J.; LA BONNARDIÈRE, C. Cellular prion protein status in sheep: tissue specific biochemical signatures. **Journal of General Virology**, v.82, p.2017-2024, 2001.

MURAMATSU, Y.; ONODERA, A.; HORIUCHI, M.; ISHIGURO, N.; SHINAGAWA, M. Detection of PrPSc in sheep at the preclinical stage of scrapie and its significance for diagnosis of insidious infection. **Archives of Virology**, v.134, p.427-432, 1993.

O'ROURKE, K. I.; BASZLER, T. V.; MILLER, J.M.; SPRAKER, T.R.; SADLER-RIGGLEMAN, I.; KNOWLES, D.P. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.1750-1755, 1998a.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrPSc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. **Veterinary Record**, v.142, p.489-491, 1998b.

O'ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; BESSER, T.E.; MILLER, J.M.; CUTLIP, R.C.; WELLS, G.A. H.; RYDER, S.J.; PARISH, S.M.; HAMIR, A.N.; COCKETT, N.E.; JENNY, A.; KNOWLES, D.P. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.3254-3259, 2000.

O'ROURKE K.I.; DUNCAN J.V.; LOGAN J.R.; ANDERSON A.K.; NORDEN D.K.; WILLIAMS E.S.; COMBS B.A.; STOBART R.H.; MOSS G.E.; SUTTON D.L. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.5, p.966-971, 2002.

PAN, K. M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R. J.; COHEN, F. E.; PRUSINER, S.B. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 90, p.10962-10966, 1993.

PARRY, H. B. Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. **Heredity**, v.17, p.75-105, 1962.

PASSOS D.T.; RIBEIRO L.A.O.; RODRIGUES NC.; HEPP D.; WEIMER T.A. PrP polymorphisms in Brazilian sheep. **Small Ruminant Research** v. 74, p. 130-133, 2008.

PATTISON, I.H.; MILLSON, G.C. Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.70, p.182-193, 1960.

PATTISON, I.H.; MILLSON, G.C. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 101-109, 1961.

PATTISON, I.H.; HOARE, M.N.; JEBBETT, J.N.; WATSON, W.A. Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. **British Veterinary Journal**, v. 130, n.4, p. 65-67, 1974.

PAULY, P.C.; HARRIS, D.A. Copper stimulates endocytosis of the protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 33107-33110, 1999.

PERGAMI, P.; JAFFE, H.; SAFAR, J. Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p.63-73, 1996.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. p. 28-29.

PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v.216, p.136-144, 1982.

PRUSINER, S.B. Scrapie prions, brain amyloid, and senile dementia. **Current Topics in Cellular Regulation**, v. 26, p. 79-95, 1985.

PRUSINER, S.B. Scrapie prions. **Annual. Reviews of Microbiology**, v.43, p.345-374, 1989.

PRUSINER, S.B. The prion diseases. **Scientific American**, v.272, n.1, p.48-57, 1995.

PRUSINER, S.B. Prion diseases and the BSE crisis. **Science**, v.278, p. 245-251, 1997.

PRUSINER, S.B. & SCOTT, M.R. Genetics of prions. **Annual Reviews of Genetics**,v.31, p. 139-175, 1997.

RACE, R.; CHESEBRO, B. Scrapie infectivity found in resistant species. **Nature**, v.392, p.770, 1998.

RIDLEY, R. M.; BAKER, H. F. To what extent is strain variation evidence for an independent genome in the agent of the transmissible spongiform encephalopathies? **Neurodegeneration**, v.5, n.3, p.219-231, 1996.

RIEK, R.; HORNE MANN, S.; WIDER, G.; BILLETER, M.; GLOCKSHUBER, R.; WÜTHRICH, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). **Nature**, v.382, p.180-182, 1996.

RIET-CORREA F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervosa em ruminantes em bovinos e equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, p.161-168, 2002.

ROBINSON, M.M.; HADLOW, W.J.; HUFF, T.P.; WELLS, G.A.; DAWSON, M.; MARSH, R.F.; GORHAM, J.R. Experimental infection of mink with bovine spongiform encephalopathy. **Journal Genetic Virology**, v.75, p.2151-2155, 1994.

ROELS, S.; VANOPDENBOSCH, E.; LANGEVELD, J.P.M.; SCHREUDER, B.E.C. Immunohistochemical evaluation of tonsillar tissue for preclinical screening of scrapie based on surveillance in Belgium. **Veterinary Record**, v.145, p.524-525, 1999.

RYDER, S.J.; SPENCER, Y.I.; BELLERBY, P.J.; MARCH, S.A. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. **Veterinary Record**, v.148, p.7-13, 2001.

RYDER, S.; DEXTER, G.; BELLWORTHY, S.; TONGUE, S. 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.

RYOU, C. Prions and prion disease: fundamentals and mechanic details. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.1059-1070, 2007.

SARGISON, N. Scrapie in sheep and goats. **In Practice**, v.17, p. 467-469, 1995.

SCHALLER, O. , FATZER, R.; STACK, M.; CLARK, J.; COOLEY, W.; BIFFIGER, K.; EGLI, S.; DOHERR, M.; VANDEVELDE, M.; HEIM, D.; OESCH, B.; MOSER, M. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrPSc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Acta Neuropathologica**, v.98, p.437-443, 1999.

SCHMERR, M.J.; CUTLIP, R.C.; JENNY, A. Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein. **Journal Chromatography** , v.802, p.135-141, 1998.

SCHREUDER, B.E.C.; VAN KEULEN, L.J.M.; VROMANS, M.E.W.; LANGEVELD, J.P.M.; SMITS, M.A. Preclinical test for prion diseases. **Nature**, v.381, p.563, 1996.

SCHREUDER, B.E.C.; GEERTSMA, R.E.; VAN KEULEN, L.J.M.; VAN ASTEN, J.A.A.M.; ENTHOVEN, P.; OBERTHÜR, R. C.; DE KOEIJER, A. A.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. **Veterinary Record**, v.142, p.474-480, 1998a.

SCHREUDER, B.E.C.; VAN KEULEN, L.J.M.; VROMANS, M.E.W.; LANGEVELD, J.P.M.; SMITS, M.A. Tonsillar biopsy and PrPs'detection in the preclinical diagnosis of scrapie. **Veterinary Record**, v.142, p.564-568, 1998b.

SCHULZ-SCHAEFFER, W.J.; TSCHÖKE, S.; KRANEFUSS, N.; DRÖSE, W.; HAUSE-REITNER, D.; GIESE, A.; GROSCHUP, M.H.; KRETZSCHMAR, H.A. The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. **American Journal Pathology**, v.156, p.51-56, 2000.

SERBEC, V.C.; BRESJANAC, M.; POPOVIC, M.; PRETNAR HARTMAN, K.; GALVANI, V.; RUPREHT, R.; CERNILEC, M.; VRANAC, T.; HAFNER, I.; JERALA, R. Monoclonal antibody against a peptide of human protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease – affected and normal brain tissue. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.3694-3698, 2003.

SHAKED, G.M.; SHAKED, Y.; KARIV-INBAL, Z.; HALIMI, M.; AVRAHAM, I.; GABIZON, R. A protease resistant PrP isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases. **Journal Biological Chemistry**, v.276, p.31479-31482, 2001.

SIMMONS, M.M.; HARRIS, P.; JEFFREY, M.; MEEK, S.C.; BLAMIRE, I.W.; WELLS, G.A. BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. **Veterinary Record**, v.138, p.175-177, 1996.

SMITS, M.A.; BOSSERS, A.; SCHREUDER, B.E C. Prion protein and scrapie susceptibility. **Veterinary Quarterly**, v.19, p.101-105, 1997.

SPRAKER, T.R.; O'ROURKE, K.I.; BALACHANDRAN, A.; ZINK, R.R.; CUMMINGS, B.A.; MILLER, M.W.; POWERS, B.E. Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.14, p.3-7, 2002a.

SPRAKER, T.R.; ZINK, R.R.; CUMMINGS, B.A.; SIGURDSON, C.J.; MILLER, M.W.; O'ROURKE, K.I. Distribution of protease-resistant prion protein and spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. **Veterinary Pathology**, v.39, p.546-556, 2002b.

SPRAKER, T.R.; BALACHANDRAN, A.; ZHUANG, D.; O'ROURKE, K.I. Variable patterns of distribution of PrPCWD in the obex and cranial lymphoid tissues of Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with subclinical chronic wasting disease. **Veterinary Record**, v.155, p.295-302, 2004.

STAMP, J.T.; BROTHERSTON, J.G.; ZLOTNIK, I.; MACKAY, J.M.K.; SMITH, W. Further studies on scrapie. **Journal of Comparative Pathology**, v.69, p.268-280, 1959.

TAYLOR, D.M. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. **Vet. J.**, v.159, p.10-17, 2000.

TAYLOR, D.M.; FRASER, H.; McCONNELL, I.; BROWN, D.A.; BROWN, K.L.; LAMZA, K.A.; SMITH, G.R.A. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. **Archives of Virology**, v.139, p.313-26, 1994.

TAYLOR, D.M.; WOODGATE, S.L.; ATKINSON, M.J. Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. **Veterinary Record**, v.137, p.605-610, 1995.

TAYLOR, D.M.; WOODGATE, S.L.; FLEETWOOD, A.J.; CAWTHORNE, R.J.G. Effect of rendering procedures on the scrapie agent. **Veterinary Record**, v.141, p.643-649, 1997.

TAYLOR, K. C. The control of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. **Veterinary Record**, v.129, p. 522-526, 1991.

TERRY, L.A.; MARSH, S.; RYDER, S.J.; HAWKINS, S.A.C.; WELLS, G.A.H.; SPENCER, Y.I. Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.152, p.387-392, 2003.

THACKRAY, A.M.; KLEIN, M.A.; AGUZZI, A.; BUJDOSO, R. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. **Journal Virology**, v.76, n.5, p. 2510-2517, 2002.

THURING, C.M.A.; MCELROY, M.C.; SWEENEY, T.; WEAVERS, E. Suitability of protuberances on the third eyelids of sheep as a biopsy site for lymphoid follicles. **Veterinary Record**, v.147, p.631-632, 2000.

VAN KEULEN, L.J.; SCHREUDER, B.E.; MELOEN, R.H.; POELEN-VAN DEN BERG, M.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.; LANGEVELD, J.P. 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. M.; SCHREUDER, B. E. C.; MELOEN, R. H.; MOOIJHARKES, G.; VROMANS, M. E. W.; LANGEVELD, J. P. M. Immunohistochemical detection of prion proteins in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.1228-1231, 1996.

VARGAS, F.; BOLEA, R.; MONLEÓN, E.; ACÍN, C.; VARGAS, A.; DE BLAS, I.; LUJÁN, L.; BADIOLA, J.J. Clinical characterization of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. **Veterinary Record**, v.156, p.318-320, 2005.

WADSWORTH, J.D.F.; JACKSON, G.S.; HILL, A.F.; COLLINGE, J. Molecular biology of prion propagation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.9, p.338-345. 1999.

WANG, S.; FOOTE, W.C.; SUTTON D.L.; MACIULIS, A.; MILLER, J.M.; EVANS, R.C.; HOLYOAK, G.R.; CALL, J.W.; BUNCH, T.D.; TAYLOR, W.D.; MARSHALL, M.R. Preventing experimental vertical transmission of scrapie by embryo transfer. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.315-327, 2001.

WATTS, J.C.; BALACHANDRAN, A.; WESTAWAY, D. The expanding universe of prion diseases. **PLoS Pathogens**, v.2, n.3, p.152-163, 2006.

WEAR, A.; HENDERSON, K.; WEBSTER, K.; PATEL, I. A comparison of rapid bovine spongiform encephalopathy testing methods on autolyzed bovine brain tissue. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 9-103, 2005.

WEISSMANN, C. A 'unified theory' of prion propagation. **Nature**, v.352, p.679-683, 1991.

WELKER, E.; RAYMOND, L.D.; SCHERAGA, H.A.; CAUGHEY, B. Intramolecular versus intermolecular disulfide bonds in prion proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, n.36, p.33477-33481, 2002.

WELLS, G.A.H.; WILESMITH, J.W. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. **Brain Pathology**, v.5, p.91-103, 1995.

WELLS, G.A.H.; SCOTT, A.C.; JOHNSON, C.T.; GUNNING, R.F.; HANCOCK, R.D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M.; BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. **Veterinary Record**, v.121, p.419-420, 1987.

WELLS, G.A.H.; HANCOCK, R.D.; COOLEY, W.A.; RICHARDS, M.S. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. **Veterinary Record**, v.125, p.521-524, 1989.

WELLS, G.A.H.; DAWSON, M.; HAWKINS, S.A.C.; GREEN, R.B.; DEXTER, I.; FRANCIS, M.E.; SIMMONS, M.M.; AUSTIN, A.R.; ORIGAN, M.W. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. **Veterinary Record**, v.135, p.40-41, 1994.

WELLS, G.A.H.; HAWKINS, S.A.C.; GREEN, R.B.; AUSTIN, A.R.; DEXTER, I.; SPENCER, Y.I.; CHAPLIN, M.J.; STACK, M.J.; DAWSON, M. Preliminary observation on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. **Veterinary Record**, v.142, p.103-106, 1998.

WELLS, G.A.H.; HAWKINS, S.A.C.; GREEN, R. B.; SPENCER, Y.I.; DEXTER, I.; DAWSON, M. Limited detection of sternal bone marrow infectivity in the clinical phase of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE). **Veterinary Record**, v.144, p.292-294, 1999.

WILESMITH, J.W.; RYAN, J.B.M. Bovine spongiform encephalopathy: recent observations on the age-specific incidences. **Veterinary Record**, v.130, p.491-492, 1992.

WILESMITH, J. W.; WELLS, G. A. H.; CRANWELL, M. P.; RYAN, J. B. M. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. **Veterinary Record**, v.123, p.638-644, 1988.

WILESMITH, J.W; RYAN, J.B.; ATKINSON, M.J. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. **Veterinary Record**, v.128,p.199-203, 1991.

WILESMITH, J.W.; HOINVILLE, L.J.; RYAN, J.M.B.; SAYERS, A.R. Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes (1986-1990). **Veterinary Record**, v.130, n.19, p.197-201, 1992.

WILL, R.G.; IRONSIDE, J.W.; ZEIDLER, M.; COUSENS, S.N.; ESTIBEIRO, K.; ALPEROVITCH, A.; POSER, S.; POCCHIARI, M.; HOFMAN, A.E.; SMITH, P.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. **The Lancet**, v. 347, p. 921-925, 1996.

WINTER, M. H.; ALDRIDGE, B. M.; SCOTT, P. R.; CLARKE, M. Occurrence of 14 cases of bovine spongiform encephalopathy in a closed dairy herd. **British Veterinary Journal**, v.145, p.191-194, 1989.

WOOD, J.L.N.; LUND, L.J.; DONE, S.H. Natural scrapie in goats: neuropathology. **Veterinary Record**, v.130, p.25-27, 1992.

ZAHN, R.; LIU, A.; LUHRS, T.; RIEK, R.; VON SCHROETTER, C.; LOPEZ-GARCIA, F.; BILLETER, M.; CALZOLAI, L.; WIDER, G.; WUTHRICH, K. NMR solution structure of the human prion protein. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.97, p.145-150, 2000.

ZHANG, H.; KANEKO, K.; NGUYEN, J.T.; LIVSHITS, T.L.; BALDWIN, M.A.; COHEN, F.E.; JAMES, T.L.; PRUSINER, S.B. Conformational transitions in peptides containing two putative alpha-helices of the prion protein. **Journal Molecular Biology**, v.250, n.4, p.514-526, 1995.

ANEXO A - Principais sinais clínicos observados em animais acometidos por EEB (adaptado a partir de BRAUN *et al.*, 1998)

<i>Sinais Clínicos</i>	<i>Percentual (%)</i>
Alterações de postura (arqueamento da coluna, epistótono ou torcicolo)	24
Alterações na condição geral	38
Má condição corporal	86
Aumento da temperatura retal (>39°C)	42
Aumento da frequência cardíaca (>80 bpm)	06
Diminuição da frequência cardíaca (44-66 bpm)	40
Hiperemia dos vasos episclerais	48
Aumento da frequência respiratória(>25 mpm)	32
Redução da frequência ruminal (<2/2 min)	04
Redução da intensidade de contração ruminal	60
Redução do grau de repleção ruminal	52
Alteração da estratificação do conteúdo ruminal	28
Teste de dor positivo	22
Auscultação com percussão e ou balotamento positivo no flanco direito	06
Motilidade intestinal reduzida	06
Alterações macroscópicas no leite	06
Califórnia mastite teste (CMT) positivo em pelo menos um quarto	42
<i>Alterações no Comportamento</i>	<i>Percentual (%)</i>
Aumento da sensibilidade sensomotora	96
Pânico	66
Apreensão	66
Nervosismo ou inquietação	64
Agressividade	42
Bruxismo	46
Salivação	30
Lamber o focinho	30
Franzir o lábio superior (<i>fleshmen</i>)	16
Fasciculação muscular	32
Nervosismo ao aproximar-se de portais ou obstáculos	12
<i>Alterações da Sensibilidade ao Toque, Som ou Luz</i>	<i>Percentual (%)</i>
Hipersensibilidade ao toque	98
Hipersensibilidade ao som	84
Hipersensibilidade à luz	45