

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

**SCRAPIE: DIAGNÓSTICO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA,
CARACTERIZAÇÃO DE SURTOS E GENÓTIPOS EM OVINOS NO BRASIL**

JULIANO DE SOUZA LEAL

PORTO ALEGRE, 2013

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

SCRAPIE: DIAGNÓSTICO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO DE
SURTOS E GENÓTIPOS EM OVINOS NO BRASIL

Autor: Juliano De Souza Leal

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinária na Área de Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. David Driemeier

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Fernando Felix Lopes

PORTO ALEGRE, 2013

Juliano De Souza Leal

CIP - Catalogação na Publicação

de Souza Leal, Juliano
Scrapie: Diagnóstico por imuno-histoquímica,
caracterização de surtos e genótipos em ovinos no
Brasil / Juliano de Souza Leal. -- 2013.
61 f.

Orientador: David Driemeir.
Coorientador: Rui Fernando Félix Lopes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2013.

1. Biópsia. 2. scrapie. 3. EETs. 4. genotipagem.
5. imuno-histoquímica. I. Driemeir, David, orient.
II. Fernando Félix Lopes, Rui, coorient. III. Título.

SCRAPIE: DIAGNÓSTICO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO DE
SURTOS E GENÓTIPOS EM OVINOS NO BRASIL

Aprovada em: 25 de março de 2013

APROVADA POR:

Prof. Dr. David Driemeier (UFRGS)
(Presidente/ Orientador)

Dra. Laura Lopes de Almeida (CPVDF)

Dr. José Reck Júnior (CPVDF)

Prof. Dra. Luciana Somme (UFRGS)

Meus sinceros agradecimentos aos professores David Driemeier e Rui Lopes, e ao Setor de Patologia Veterinária, cuja lealdade e espírito de grupo tornaram esta produção uma realidade.

RESUMO
Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**SCRAPIE: DIAGNÓSTICO POR IMUNO-HISTOQUÍMICA,
CARACTERIZAÇÃO DE SURTOS E GENÓTIPOS EM OVINOS NO BRASIL**

AUTOR: JULIANO DE SOUZA LEAL
ORIENTADOR: DAVID DRIEMEIER
CO-ORIENTADOR: RUI FERNANDO FELIX LOPES
Porto Alegre, março de 2013.

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs), ou doenças do príon, ocorrem tanto nos animais como no homem, são responsáveis por doenças transmissíveis e hereditárias e provocam lesões degenerativas no encéfalo. A presença de uma forma proteica anormal (PrP^{Sc}), ao invés da sua forma normal (PrP^C), no tecido encefálico e linforreticular é característica peculiar das EETs. Essa proteína é altamente insolúvel, resistente à degradação por proteases e se deposita eventualmente sob forma de placas amiloides na substância cinzenta. Tais placas provocam a morte maciça de neurônios e células gliais, causando vacuolização intensa no tecido afetado. A partir da implantação do programa de vigilância epidemiológica da encefalopatia espongiforme bovina (EEB), coordenado pelo Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Outras Encefalopatias (PNCRH) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Setor de Patologia Veterinária da UFRGS tem sido requisitado frequentemente para realização de exames de necropsias e de materiais de animais com suspeita de scrapie. A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é o teste para o diagnóstico das EETs mais específico disponível até o momento, sendo cada vez mais utilizado para diagnóstico, rastreamento, estudo da patogênese e fornecimento de informações comparativas em nível molecular. Por outro lado, a genotipagem é uma ferramenta importante no auxílio da identificação da suscetibilidade genética a scrapie, tornando o diagnóstico mais seguro, além de possibilitar a identificação de casos atípicos de scrapie, como a Nor98. Este trabalho consistiu na realização da IHQ para proteína priônica no tecido nervoso e no tecido linforreticular, como método diagnóstico de scrapie em ovinos e caprinos, associado à genotipagem dos ovinos. Entre 2009 e 2012 foram realizadas colheitas de materiais para exames de IHQ e coloração por hematoxilina-eosina em amostras de tecidos de ovinos das raças Suffolk, Santa Inês, Dorper e mestiços. As amostras foram obtidas a partir de biopsias e necropsias para diagnóstico de scrapie. Foi realizada também a genotipagem nos animais para os códons 136, 154 e 171 da proteína PRP, e em alguns casos no códon 141. Foram realizadas três repetições da IHQ para cada amostra positiva para PrP^{Sc}. O diagnóstico por IHQ no tecido linforreticular foi considerado positivo quando o material apresentou um número de, no mínimo, três folículos linfóides com centros germinativos marcados pela técnica. Entre os resultados obtidos neste trabalho pode-se incluir o primeiro diagnóstico positivo para scrapie de genótipo resistente (ARR/ARR) não Nor98, na espécie ovina no Brasil, com marcação por IHQ nas tonsilas palatínicas, terceira pálpebra e mucosa reto-anal. Este animal era pertencente a um rebanho de ovinos mestiços Suffolk, no qual foram diagnosticados mais nove animais positivos para scrapie nas tonsilas palatínicas, terceira pálpebra e mucosas reto-anal. A coleta e envio de material de vários órgãos linfóides foi considerada importante por possibilitar a confirmação da presença ou não do agente em pelo menos dois deles, reduzindo o número de casos considerados suspeitos, o risco de falsos positivos, e parte, senão a totalidade, dos casos com material insuficiente para diagnóstico. Em necropsia, a coleta de tonsilas palatínicas mostrou-se eficaz pelo seu alto índice de marcação positiva. A coleta de amostras de sangue foi importante para a realização do teste de genotipagem, permitindo avaliar o grau de resistência/suscetibilidade do animal, complementando os resultados de IHQ.

Palavras-chave: Biopsia, scrapie, EETs, genotipagem, imuno-histoquímica

ABSTRACT
Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SCRAPIE: DIAGNOSIS BY IMUNOHISTOCHEMISTRY, AND GENOTIPING OF SHEEP IN
BRAZIL

AUTHOR: JULIANO DE SOUZA LEAL
ADVISER: DAVID DRIEMEIER
CO-ADVISER: RUI FERNANDO FELIX LOPES
PORTO ALEGRE, March, 2013

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), the prion diseases, occurs both in animals and in humans, are responsible for a transmissible and hereditary disease, and cause degenerative lesions in the brain tissue. The presence of an abnormal protein (PrP^{Sc}), instead of its normal form (PrP^C), on the nervous and lymphoreticular tissue is characteristic of TSEs. This protein is highly insoluble and resistant to degradation by proteases and eventually settles in the gray matter in the form of amyloid plaques that causes massive death of neurons and glial cells, causing intense vacuolization in the affected tissue. After the establishment of the Bovine Spongiform Encephalopathy surveillance program, coordinated by the National Rabies and Other Encephalopathies Control Program, the Setor de Patologia Veterinária of UFRGS has been usually required to proceed necropsy and other diagnosis in suspicious animals. The immunohistochemistry (IHC) is the most specific technique actually used to TSEs identification, being increasingly used to diagnosis, traceability, pathogenesis study and providing comparative information on the molecular level. On the other hand, genotyping is an important tool on scrapie genetic susceptibility identification, making more secure the diagnosis, beyond to enable the atypical scrapie cases identification, like Nor98. This work consisted to performing IHC to prionic protein, on nervous system and lymphoreticular tissue, as scrapie diagnostic method in sheep and goat, associate to genotyping in sheep. Sheep tissues were sampled from Suffolk, Santa Inês, Dorper and crossbreed to proceed IHC and hematoxylin-eosin staining between 2009 and 2012. The samples were obtained by biopsy and necropsy to scrapie diagnose. Genotyping of codons 136, 154 and 171 of PRP protein was performed, as well as a few of codon 141. The monoclonal antibody anti-prion F98/160.1.5 and F99/97.6.1 was used at the IHC. For each positive sample three repetitions were performed. The diagnostic by IHC at lymphoreticular tissue was considered positive when it shows at minimum three follicles with germinal centers stained. Among the obtained results, could be included the first diagnostic of scrapie not Nor98 in resistant genotype (ARR/ARR) sheep in Brazil. This animal belongs to a Suffolk sheep flock in which were diagnosed more nine scrapie positive animals showing IHC staining on tonsils, third eyelid and rectal mucosa. The sampling and dispatch of many lymphoid tissues was considered important to enable the confirmation of agent presence or not in at least two of them, reducing the number of suspicious cases, the risk of false positive, and part, if not all, of cases with insufficient material for diagnosis. At necropsy, the tonsils collecting showed efficient by the it high positive staining level. Blood sampling becomes important to proceed genotyping test, allowing measure the animal resistance/susceptibility grade, complementing the IHC results.

Key words: Biopsy, scrapie, TSEs, genotyping, immunohistochemistry

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	A doença e o agente infeccioso	9
2.2	Características do príon	10
2.3	Principais genótipos associados à resistência/suscetibilidade a scrapie	11
2.4	Métodos de diagnóstico	14
3	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1	Artigo 1	17
3.2	Artigo 2	30
4	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura brasileira é uma atividade econômica em expansão, principalmente nos Estados do Nordeste e do Sul. No Brasil, excluindo o Rio Grande do Sul, os rebanhos são predominantemente voltados para a produção de carne. Existe uma demanda no mercado interno pela carne ovina maior que a produção atual. Dessa forma, o comércio de reprodutores está aquecido, devido à procura para criar ou estabelecer novos plantéis. A atividade passou, também, a ser valorizada entre criadores do Sudeste e do Centro-Oeste do País e alguns animais alcançaram preços altos, principalmente nas raças Suffolk, Dorper e Santa Inês.

O aumento da produção de carnes e a exportação de reprodutores são uma fonte segura de geração de recursos e empregos, no entanto, para isso o País precisa incrementar o controle da sanidade de seus rebanhos e praticar manejo sanitário condizente com os protocolos de exportação. Um dos problemas sanitários do rebanho, e que faz parte das doenças listadas pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE; World Organization for Animal Health), é a paraplexia enzoótica dos ovinos ou scrapie, uma doença do grupo das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EETs). Doença de caráter neurodegenerativo e fatal, atinge ovinos e caprinos e está relacionada com a encefalopatia espongiforme bovina (EEB). Scrapie é uma das doenças alvo tanto do Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros (PNCRH) como das ações para a prevenção e controle das EETs.

O Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) está credenciado, desde 2002, para fazer exames histológicos de vigilância de EETs para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e, a partir de 2004, é o único laboratório nacional credenciado pelo MAPA (Portaria Nº 41, de 15 de junho de 2004) para a realização de imuno-histoquímica anti-príon, para monitoramento das EETs. Neste período, já foram realizados mais de 7000 exames para as EETs, sendo aproximadamente 600 exames de terceira pálpebra e/ou mucosa reto-anal de ovinos para a vigilância de scrapie. Entre os anos de 2005-2012 dos 741 ovinos analisados, 81 (10,9%) foram positivos para scrapie na imuno-histoquímica, sendo que ovinos das raças de “cara negra” são os mais afetados.

Um dos métodos utilizados em vários países para controle da scrapie é o melhoramento genético baseado na seleção de animais com maior resistência à

apresentação clínica da doença. A genotipagem dos rebanhos e dos reprodutores brasileiros pode representar segurança para rebanhos de raças de “cara-negra” e aumentar o valor comercial dos animais comprovadamente resistentes. Sabe-se que mesmo o príon de EEB não evolui em ovinos geneticamente resistentes para scrapie. Há cepas, como a Nor98, que afetam animais geneticamente resistentes para scrapie clássica detectadas em países europeus, mas com prevalência baixa. O método de diagnóstico da doença *in vivo* deve ser integrado à seleção genética, pois o diagnóstico precoce da doença em animais geneticamente suscetíveis evita disseminação maior no rebanho. O agente é infeccioso e, mesmo em países como a Nova Zelândia, reconhecido como país livre da doença, há genótipos suscetíveis.

Os objetivos deste trabalho foram realizar o diagnóstico de scrapie através do método de imuno-histoquímica e a caracterização genotípica dos ovinos quanto à susceptibilidade a doença. Considerou-se que a comparação entre os resultados de imuno-histoquímica e de genotipagem pode ser útil para orientar o melhoramento genético baseado na seleção de animais com maior resistência à apresentação da doença.

A seguir, serão apresentados uma breve revisão de literatura sobre o scrapie e dois artigos científicos. O primeiro artigo aborda a utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal para diagnóstico de scrapie em ovinos, em uma propriedade da Região Sul do Brasil. Este artigo foi publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira e relata a coleta de material de biopsia a campo, para diagnóstico de scrapie pré-clínico pela técnica de imuno-histoquímica; são descritas as técnicas de contenção, coleta, processamento e análise das amostras para o diagnóstico da doença. O segundo artigo, intitulado “Diagnóstico de scrapie clássica em ovinos com genótipo ARR/ARR no Brasil”, descreve um surto de scrapie em propriedade na região Sudeste do Brasil, no município de Valparaíso, no Estado de São Paulo. Neste artigo, são abordadas a coleta de biopsia para diagnóstico de scrapie pela técnica de imuno-histoquímica e a coleta de amostras de sangue para a realização da genotipagem dos animais; a classificação genotípica dos animais, em graus de risco para possível desenvolvimento da doença quando em contato com o agente etiológico, foram comparados os resultados de imuno-histoquímica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A doença e o agente infeccioso

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 tem mantido esses países livres da enfermidade (SARGISON, 1995).

O agente infeccioso, o 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, tonsilas e linfonodos) apresentam um acúmulo da forma anormal (PrP^{Sc}) da proteína (PRUSINER e SCOTT, 1997). Os animais podem ser portadores saudáveis da enfermidade (O'ROURKE *et al.*, 2002).

Scrapie é bastante conhecido em ovinos e também foi diagnosticado 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 e DONE, 1992). Além disso, os caprinos são mais suscetíveis a uma forma diferente de scrapie, conhecida como scrapie atípico ou Nor98 (BENESTAD *et al.*, 2003). Caprinos podem ser portadores saudáveis de scrapie, permitindo que cepas de scrapie persistam na população de ovinos. Sistemas de produção caracterizados por uma criação mista de ovinos e caprinos, onde a prevalência de scrapie em caprinos é geralmente menor do que em ovinos, representam um problema para a economia e para o bem-estar animal (COLUSSI *et al.*, 2010).

2.2 Características do príon

A proteína priônica (PrP^{Sc}), ou príon, 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 e 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 e 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 à membrana plasmática (PRUSINER e SCOTT, 1997; LYSEK *et al.*, 2005).

A análise do gene PRNP em ovinos está ligada ao polimorfismo genético da suscetibilidade da doença ao agente (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 variações na sequência nucleotídica que geram alteração na conformação da proteína e são encontradas em posições dos códons da PrP ovina (ACÍN *et al.*, 2004). Existem três regiões do gene PRNP, que estão ligados principalmente à suscetibilidade dos animais ao agente (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 suscetibilidade 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 suscetibilidade frente ao scrapie e a combinação A136R154R171 em homozigose está associada à resistência frente à infecção (HUNTER *et al.*, 1993; FOSTER *et al.*, 1996).

2.3 Principais genótipos associados à resistência/suscetibilidade a scrapie

A classificação para as diferentes combinações alélicas, agrupando os genótipos em cinco grupos de risco (R1 a R5), sendo R1 o mais resistente e R5 o mais suscetível (Tabela 1), foi proposto primeiramente por Dawson *et al.* (1998). Entretanto, sabe-se que para a ocorrência de scrapie é necessário que o animal tenha contato com o agente infeccioso; desta forma, não havendo este contato, a doença adquire um caráter exclusivamente genético (DAWSON *et al.*, 2008).

TABELA 1 - Classificação dos diferentes genótipos encontrados em ovinos quanto à resistência/suscetibilidade ao príon, em raças onde os cinco alelos (ARR, AHQ, ARH, ARQ e VRQ) estão presentes nas posições 136, 154 e 171 (DAWSON *et al.*, 2008).

Risco	Genótipos
R1	ARR/ARR
R2	ARR/ARQ
R3	ARQ/ARQ ARQ/ARH ARH/ARH
R4	ARR/VRQ
R5	ARQ/VRQ

R1 indica menor suscetibilidade à scrapie; R5 indica maior suscetibilidade à scrapie.

Embora não haja evidências da transmissão de scrapie para seres humanos em mais de 250 anos de exposição (SCHNEIDER *et al.*, 2008), as incertezas associadas com as barreiras das espécies levaram muitos países a desenvolver políticas destinadas a eliminar todos os animais afetados por EETs de suas cadeias de alimentos, incluindo

scrapie em ovelhas (HUNTER *et al.*, 1996; BAYLIS *et al.*, 2002).

Na Grã-Bretanha, o serviço de genotipagem comercial dos rebanhos ovinos foi disponibilizado em 1994. Inúmeros rebanhos foram integrados no programa de controle baseado na genotipagem e descarte seletivo dos genótipos mais suscetíveis e com maiores riscos de desenvolver a doença clinicamente. Após o descobrimento da variante da doença de Creutzfeld-Jakob (vDCJ) (WILL *et al.*, 1996) e da evidência de que a EEB poderia ser experimentalmente transmitida para ovinos pela via oral (FOSTER *et al.*, 1993; BELLWORTHY *et al.*, 2005) houve a recomendação do Comitê de Encefalopatias Espongiformes para um programa nacional de controle, baseado na genotipagem do gene PRNP. Dessa maneira, em 2001, foi lançado na Grã-Bretanha o National Scrapie Plan (NSP) para rebanhos de raças puras registradas e, em 2002, para rebanhos de raças puras não registradas (RODEN *et al.*, 2006). O NSP, que é voluntário, atualmente tem como base o Ram Genotyping Scheme (RGS), baseado na seleção positiva de reprodutores com alelo ARR e na seleção negativa para o alelo VRQ. Aproximadamente 600.000 carneiros já foram genotipados em 12.000 rebanhos (DAWSON, 2006). O NSP serve de guia para as restrições de utilização em cruzamentos, de acordo com o genótipo dos animais.

Em geral, pode se dizer que a suscetibilidade está ligada aos homozigotos AA136RR154QQ171 (ARQ/ARQ) e VV136RR154QQ171 (VRQ/VRQ). A resistência se relaciona ao alelo A136R154R171 (ARR), cuja presença reduz a suscetibilidade frente ao scrapie a tal ponto, que a maioria dos animais que portam esse alelo é resistente ao agente, existindo uma baixa suscetibilidade, que varia de acordo com o alelo que o acompanha (HUNTER *et al.*, 1993; 1996).

Os polimorfismos na posição 171 estão claramente ligados a suscetibilidade a scrapie, onde a presença do alelo R171 em homozigose e heterozigose confere maior resistência ao scrapie (BOSSERS *et al.*, 1996; 2000). A combinação dos demais alelos apresenta resistência e suscetibilidade intermediárias e variáveis.

Análises de polimorfismo no códon 171, em diferentes raças do Brasil, demonstraram que, entre 172 ovinos Hampshire Down, 37,21% apresentavam genótipo suscetível (Q171/Q171) e, entre 129 ovinos Suffolk, 48,84% eram animais altamente suscetíveis (PASSOS *et al.*, 2008). Na genotipagem feita em 58 ovinos da raça Santa Inês foi observado que 20,7% apresentam genótipo ARQ/ARQ, 1,7% genótipo VRQ/VRQ e 50% dos animais avaliados apresentavam outros genótipos com

suscetibilidade intermediária à scrapie (LIMA *et al.*, 2007).

Em caprinos, os polimorfismos nos códons 142, 143, 146, 154, 211 e 222 podem modular a susceptibilidade à scrapie, mas nenhuma associação foi provada até agora (GOLDMANN *et al.*, 1996;. BILLINIS *et al.*, 2002; ACUTIS *et al.*, 2006;. VACCARI *et al.*, 2006;. PAPASAVVA-STYLIANOU *et al.*, 2007;. BARILLET *et al.*, 2009). Nesta espécie, o polimorfismo K222 se apresenta como um candidato promissor para a seleção em um programa de melhoramento genético contra scrapie clássico. Este polimorfismo tem sido associado à resistência encontrada em rebanhos caprinos na Europa com um bom nível de significância estatística (COLUSSI *et al.*, 2010), assim como a alteração no códon HR143 que confere uma proteção moderada contra scrapie clássico (BILLINIS *et al.*, 2002).

Alguma variabilidade quanto à neuropatologia, especialmente na intensidade e na distribuição da espongiose, pode ocorrer devida às diferenças no agente infectante (PATTISON e MILLSON, 1961), podendo também ocorrer transmissão entre caprinos sem o contato com ovinos (BROTHERSTON *et al.*, 1968).

A distribuição de padrões neuroanatômicos do PrP^{Sc} no óbex define um aspecto específico do fenótipo do tremor epizoótico ovino. Este padrão específico é apenas um dos parâmetros que definem o fenótipo completo de qualquer tipo de EET, estreitando a associação entre estas características fenotípicas e o genótipo do gene PRNP nas posições 136, 154 e 171 (SPIROPOULOS *et al.*, 2007). Esses dados sugerem que aspectos distintos da patologia em scrapie natural, tais como perfis de vacuolização (LIGIOS *et al.*, 2002), deposição amilóide vascular (LIGIOS *et al.*, 2004) e aspectos da microscopia eletrônica (ERSDAL *et al.*, 2003), também se correlacionem com o genótipo do gene PRNP nas posições 136, 154 e 171. As correlações genótípicas da PrP nas posições 136, 154 e 171 também não são absolutas, indicando a existência de outros fatores de efeito importante sobre a doença. Tais fatores incluem a variabilidade do gene PRNP em outras posições diferentes das posições 136, 154 e 171 (MOUM *et al.*, 2005), e as cepas do agente infeccioso (BRUCE, 2003).

Foram identificadas e descritas 12 diferentes cepas de PrP^{Sc}, classificadas em quatro categorias. Os padrões puntiformes, granulares e coalescência foram todos agrupados como depósitos em neuropilo (GONZALEZ *et al.*, 2002). Entretanto, a marcação imuno-histoquímica de cada uma destas cepas de PrP^{Sc} em núcleos neuroanatômicos com distintos padrões de marcação no óbex são associados com

genótipo, em particular na posição 136 (SPIROPOULOS *et al.*, 2007). Os padrões de marcação da PrP^{Sc} são definidos principalmente pela estirpe infectante do príon mas, em condições de campo, o genótipo influencia a seleção após a exposição ao agente; acredita-se na existência de uma relação dinâmica entre as cepas do agente e o gene PRNP, tornando evidente que, na natureza, o fenótipo da doença é influenciado por ambos os parâmetros (genótipo e cepa do príon) e mais alguns outros fatores que podem ainda ser desconhecidos (SPIROPOULOS *et al.*, 2007).

As principais diferenças da doença entre ovinos e caprinos residem na distribuição da PrP^{Sc} no sistema nervoso central (SNC) e nos padrões imunobioquímicos obtidos por *Western blot* (BENESTAD *et al.*, 2008). Em caprinos, a intensidade da imunocoloração do PrP^{Sc} é principalmente observada no cerebelo, enquanto o perfil de *Western blot* mostra uma banda de migração rápida de cerca de 11-12 kDa (BENESTAD *et al.*, 2008).

2.4 Métodos de diagnóstico

A maioria dos métodos de diagnóstico para detecção PrP^{Sc} depende da sua resistência à protease e da identificação pela utilização de anticorpos anti-PrP. No entanto, uma dificuldade fundamental com anticorpos em EETs é que não podem discriminar especificamente PrP^C de PrP^{Sc}.

Em muitos casos, a PrP^{Sc} é detectada no líquido cefalorraquidiano (LCR) mais cedo que no cérebro, exceto para os ovinos com genótipos resistentes ou de pouca acumulação periférica (JEFFREY e GONZALEZ, 2007). Ensaios em cérebro e tecido linfóide fornecem maior sensibilidade na detecção, pelo menos em ovelhas (JEFFREY e GONZALEZ, 2007) e alces (SPRAKER *et al.*, 2002), mas não em cervos (HIBLER *et al.*, 2003). Tecidos linfóides de escolha incluem os linfonodos retrofaríngeos mediais e as tonsilas devido à sua acessibilidade para amostragem e sua estreita associação com o trato gastrointestinal. 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).

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.*, 2002), 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).

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 continua 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 tecidos linfoides depositados sobre a terceira pálpebra também pode ser usada (O'ROURKE *et al.*, 2000), mas em muitos casos, obtém-se tecido linfoide 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 3 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 (BRAUN *et al.*, 1998).

O diagnóstico confirmatório é feito pelo exame laboratorial para a detecção do príon, pela técnica da imuno-histoquímica (IHQ). Pode ser realizado *in vivo*, pela colheita de tecidos linfoides na terceira pálpebra e mucosa reto-anal ou tonsilas e, após a morte do animal, é realizado o teste em amostras de tecidos do sistema nervoso central (ROELS *et al.*, 1999).

Há mais de 20 cepas diferentes de scrapie, às vezes até duas cepas podem estar presentes num mesmo animal. Essa caracterização é baseada no perfil de inoculações em camundongo. Atualmente, o grande desafio é diferenciar EEB de scrapie em animais, através de testes diagnósticos simples (HADLOW, 1999; SOTO, 2004; GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005). O príon de EEB não evolui em ovinos geneticamente resistentes para scrapie (BRADLEY, 1994; MARTIN *et al.*, 2005). Há cepas que afetam animais geneticamente resistentes detectadas em países europeus, mas com prevalência baixa (SOTO, 2004; GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005).

Existem predisposições genéticas resultantes da sequência dos genes da proteína PrP^C do hospedeiro, que os favorece a expressar a PrP^{Sc} e desenvolver a doença. Em biologia molecular, inúmeras pesquisas têm sido feitas visando detectar animais predispostos a sofrerem infecção. Como já foi citado anteriormente, sabe-se que a sequência dos aminoácidos nos códons 136, 154 e 171 da proteína PrP^C tem relação com a manifestação de scrapie (WEISSMANN *et al.* 2002, GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005).

3 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Artigo 1

Utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil

Juliano de Souza Leal, Gabriel Laizola Frainer Correa, André Gustavo Cabrera Dalto, Gisele Silva Boos, Eduardo Conceição Oliveira, Paulo Motta Bandarra, Rui Fernando Felix Lopes e David Driemeier

Artigo publicado na revista Pesquisa Veterinária Brasileira, volume 32, número 10, páginas 990-994, outubro de 2012 [*Pesq. Vet. Bras.* **32(10):990-994, outubro 2012**].

Utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil¹

Juliano S. Leal², Gabriel L.F. Correa², André G.C. Dalto², Gisele S. Boos², Eduardo C. Oliveira², Paulo M. Bandarra², Rui F.F. Lopes³ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Leal J.S., Correa G.L.F., Dalto A.G.C., Boos G.S., Oliveira E.C., Bandarra P.M., Lopes R.F.F. & Driemeier D. 2012. [Use of third eyelid and rectal mucosa biopsies for diagnosis of sheep scrapie on a farm in Southern Brazil.] Utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(10):990-994. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br.

Scrapie, a form of transmissible spongiform encephalopathy (TSEs) is a fatal neurodegenerative disorder that affects sheep and goats. The disease is characterized by an accumulation of the abnormal prionic protein (PrP^{Sc}) in the encephalic and lymphoreticular tissues. This paper describes the use of anti-prionic protein immunohistochemical (IHC) procedure as a method of pre-clinical diagnosis of scrapie. The test was carried out in biopsied lymphoreticular tissues from third eyelid and rectal mucosa. Anti-prion protein monoclonal antibodies F89/160.1.5 and F99/97.6.1 were used. Scrapie diagnosis in lymphoreticular tissues through IHC was achieved when the samples had a minimum of three lymphoid follicles in well delimited germinal centre. Positive immunostaining was identified in 19 out of 318 samples of the third eyelid. Material sampled at post-mortem examination in 18 of these scrapie-positive sheep, which were previously verified by biopsy, and in 21 of its relatives, was confirmed with IHC tests. Positive immunostaining from rectal mucosa tissue was not

¹Recebido em 7 de junho de 2012.

Aceito para publicação em 26 de junho de 2012.

²Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170.

observed. Third eyelid and tonsil were the organs with the larger amount of positive immunostaining (18/18 and 8/18 respectively) at post-mortem examination. None positive result was obtained along the 21 animals related to the positive ones, and none of the positive cases showed IHC labeling in the brain. The use of lymphoid tissues for scrapie diagnosis by IHC through biopsies showed to be a viable and efficient method for pre-clinical diagnostic.

INDEX TERMS: Sheep, scrapie, biopsy, lymphoid, immunohistochemistry.

RESUMO.- Scrapie é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET) que causa lesões cerebrais degenerativas em ovinos e caprinos. Caracteriza-se pelo acúmulo, no tecido encefálico e linforreticular, da forma anormal da proteína priônica (PrP^{Sc}) que provoca a morte maciça de neurônios e células gliais, além de vacuolização intensa no tecido afetado. Esse trabalho descreve a utilização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para proteína priônica em tecido linforreticular de biopsias de terceira pálpebra e mucosa retal, como método diagnóstico de scrapie em ovinos. Realizaram-se exames de IHQ para scrapie em amostras de uma propriedade de origem de um ovino com diagnóstico dessa enfermidade. Utilizaram-se anticorpos monoclonais antiPrP^{Sc} para diagnóstico *ante mortem* pela técnica de IHQ. Nas 318 amostras de biopsias analisadas, encontrou-se 19 resultados positivos para PrP^{Sc} nos folículos de terceira pálpebra e não foi obtida marcação no tecido linfático de mucosa retal em nenhuma das amostras coletadas. Realizaram-se 18 necropsias dos animais positivos anteriormente por biopsia e 21 necropsias de ovinos parentes dos positivos de scrapie. Confirmou-se o resultado de scrapie pela IHQ após a necropsia dos animais positivos nas biopsias de terceira pálpebra. Nesses animais, os órgãos com maior número de cortes positivos foram a terceira pálpebra (18/18) e a tonsila (8/18). Nos ovinos com parentesco com os positivos, nenhum resultado de scrapie ocorreu. A utilização de tecidos linfóides no diagnóstico de scrapie por IHQ através de biopsias mostrou-se um método viável e eficaz para o diagnóstico pré-clínico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Ovinos, scrapie, biopsia, linfoide, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

Scrapie é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET) que afeta ovinos e caprinos (Prusiner 1995). As características dessa doença incluem um longo e variável período de incubação (Wood et al. 1992) que é, provavelmente, afetado pela dose do agente infeccioso, idade do animal, genótipo do animal e da cepa da proteína priônica infectante (PrP^{Sc}) (Hoinville 1996, Hunter 1997, Fraser 2000, Billinis et al. 2002). Em ovinos, scrapie ocorre, principalmente, entre dois e cinco anos de idade (Fraser 2000). Há evidências de que, em rebanhos endemicamente infectados, scrapie é transmitido principalmente durante o período perinatal (Hoinville 1996). Scrapie provoca vacuolização neuronal e do neurópilo e a acumulação da forma anormal da proteína priônica (PrP^{Sc}) no sistema nervoso central (SNC) ao contrário da proteína celular normal do hospedeiro (PrP^C) (Prusiner 1982). A forma mais comum é a Forma Clássica de Scrapie e pode ser detectada precocemente em tecidos linfoides. Uma forma atípica, Nor98, afeta ovinos com genótipo resistente para a forma clássica e tem se tornado comum na Europa (Andréoletti et al. 2011).

O diagnóstico de scrapie em ovinos com sinais clínicos é realizado pelo exame histológico com detecção de vacuolização neuronal e do neurópilo e mediante detecção imuno-histoquímica (IHQ) de PrP^{Sc} no encéfalo de ovinos (Miller et al. 1993). A IHQ é particularmente útil para o diagnóstico de scrapie em ovinos no início do estágio clínico da doença, quando as alterações histológicas são leves, ou em casos com amostras com autólise inicial. A técnica também é útil para identificação do agente em ovinos na fase pré-clínica da doença pela detecção de PrP^{Sc} em tecidos linfóides antes do envolvimento do SNC (Ikegami et al. 1991, Schreuder et al. 1998). Baseando-se nessa perspectiva, métodos de diagnósticos pré-clínicos de scrapie, utilizando-se biopsias de tonsila (Schreuder et al. 1998), terceira pálpebra (O'Rourke et al. 2000) e da mucosa retal (González et al. 2008) são descritos para controle da enfermidade.

O presente trabalho descreve a utilização da técnica de IHQ com a coleta de material por biopsias de terceira pálpebra e mucosa retal de ovinos para o diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil com a posterior necropsia dos animais positivos e parentes desses, como medida de controle da doença, e para análise e comparação da eficácia da técnica de IHQ em órgãos linfoides.

MATERIAL E MÉTODOS

Diagnósticos *ante mortem* de scrapie em ovinos foram realizados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) com a realização de biopsias de terceira pálpebra e mucosa retal em uma propriedade na Região Sul do Brasil. Essa propriedade foi responsável pela venda de um ovino da raça Suffolk que apresentou sinais clínicos e achados patológicos e imuno-histoquímicos que comprovaram scrapie.

Coletou-se fragmentos de tecido linfóide de terceira pálpebra e da mucosa retal de 318 ovinos através de biopsia para exame histológico e posterior IHQ para PrP^{Sc}. A avaliação histológica prévia ocorreu pela necessidade de ter no mínimo três folículos para posterior realização da IHQ de scrapie em órgãos linfóides.

Para efetuar as biopsias, os animais foram contidos por, pelo menos, um operador e os tecidos de terceira pálpebra e de mucosa retal foram coletados por outros dois operadores. Na coleta da terceira pálpebra, administrou-se colírio oftalmológico (Colírio anestésico®, cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%, Laboratório Allergan, Brasil) no olho esquerdo. Em seguida, o tecido linfóide bulbar era visualizado sob a superfície interna da terceira pálpebra, como um tecido protuberante ligeiramente róseo, na porção medial dos olhos. A mucosa da terceira pálpebra foi pinçada, levemente tracionada para afastá-la do tecido conjuntivo subjacente e, com auxílio de uma tesoura curva Metzenbaum, realizou-se um corte para retirada da amostra (Fig.1).

Após a coleta de terceira pálpebra, utilizou-se outro conjunto de pinça e tesoura curva para excisão de um fragmento de mucosa retal, coletado aproximadamente a 2cm cranial da linha de junção da mucosa reto-anal, ventralmente (Fig.2). Aplicou-se 0,5ml de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor (Xylestesin®, Laboratório Cristália, Brasil) na mucosa retal, com auxílio de um espéculo ginecológico de tamanho médio humano vagispec® introduzido no reto do animal. Após a coleta da amostra e a retirada do espéculo realizou-se a administração tópica de repelente, cicatrizante em aerosol (Bactrovet Prata AM®, Laboratório König do Brasil).

As amostras de terceira pálpebra e de mucosa retal foram fixadas em formol tamponado 10% neutro durante 24 horas e processadas pelas técnicas de rotina histológica e subsequente coloração em hematoxilina-eosina (HE) (Fig.3). A detecção

do príon pela técnica de IHQ ocorreu pelo método estreptavidina-biotina ligada à peroxidase. Inicialmente os cortes histológicos foram desparafinados e tratados em solução 10% de peróxido de hidrogênio (Merck, Darmstadt, Germany) em metanol por 20 minutos, lavados em água destilada e tratados com ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Germany) por cinco minutos. Posteriormente, realizou-se: a lavagem com água destilada e TBS (Tris base, Tris-HCl, NaCl; DAKO®, Carpinteria, USA), por dois minutos; lavagem rápida com 0,1% de Tween (Sigma Chemical Co., Saint Louis, USA) diluído em TBS, por um minuto; lavagem em água destilada, por um minuto; recuperação antigênica e eliminação de PrP^C com proteinase K (DAKO Cytomation, Carpinteria, USA), por um minuto e lavagem em água destilada gelada. Para a diminuição das ligações inespecíficas, utilizou-se leite desnatado (Molico®, Nestlé, Brasil) na diluição de 5%, por 20 minutos, e lavados em TBS, por dois minutos.

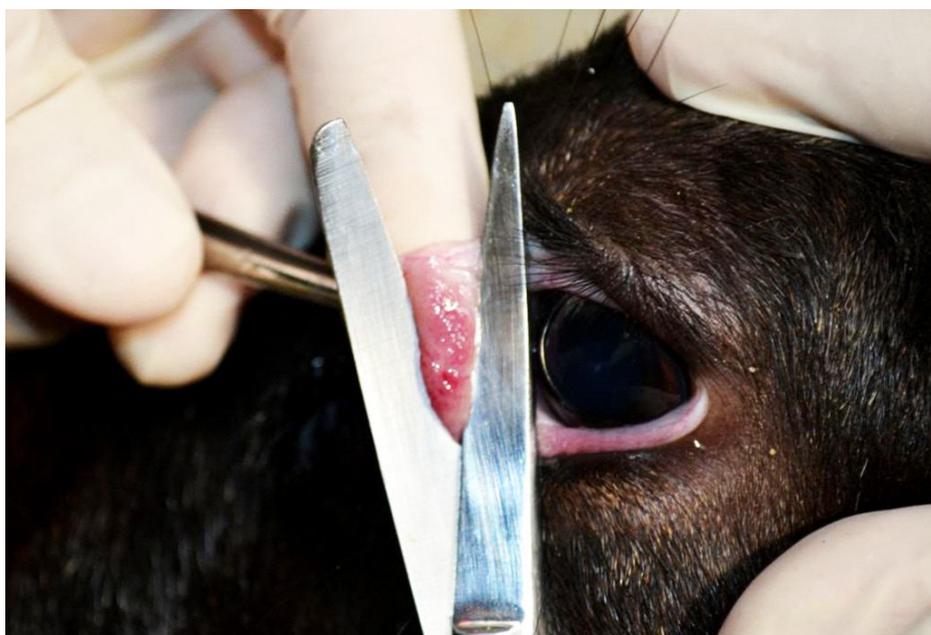


Fig.1. Técnica para coleta de biópsia de terceira pálpebra em ovino para imuno-histoquímica de scrapie. Exposição da terceira pálpebra com auxílio da fixação por pinça para retirada do tecido com tesoura.

Os dois anticorpos monoclonais anti-príon F89/160.1.5 e F99/97.6.1 (VMRD Pullman, EUA) foram diluídos em 1:500 cada um e misturados e os cortes histológicos incubados a 37°C com os anticorpos em câmara úmida por 12 horas. Posteriormente,



Fig.2. Técnica para coleta de biopsia de mucosa retal em ovino para imunohistoquímica de scrapie. Exposição da mucosa retal com auxílio de espéculo, após anestesia local, pinçamento e corte com tesoura.

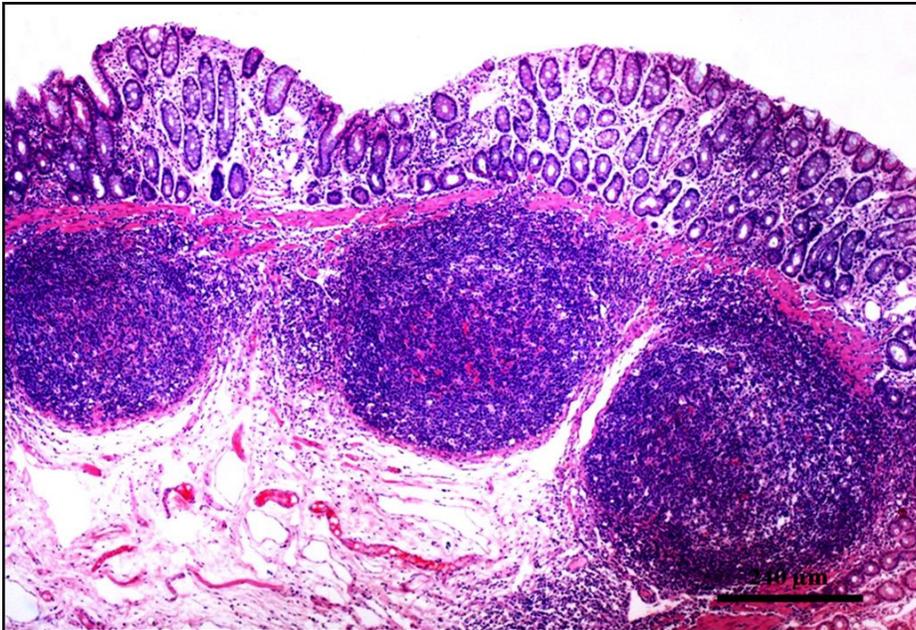


Fig.3. Corte histológico de biopsia de mucosa retal de ovino, folículos linfóides com centro germinativo bem delimitado. HE, obj.10x.

aplicou-se o anticorpo secundário biotilado ligado a estreptavidina-peroxidase (DAKO LSAB 2 kit®, DAKO Corp., Carpinteria, EUA), por 20 minutos em cada etapa. A reação da IHQ foi revelada com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB, DAKO Corp., Carpinteria, EUA) durante um minuto, e as lâminas contracoradas com hematxilina. Como controle positivo, utilizaram-se cortes histológicos de tronco cerebral na altura do óbex, linfonodo mesentérico e tonsila de ovino, comprovadamente positivos para scrapie. Como controle negativo, utilizou-se material de cérebro e órgãos linfoides de ovinos com diagnóstico prévio negativo para scrapie e de cérebro de bovino negativo para encefalopatia espongiforme bovina (EEB).

Diante de resultados positivos na IHQ, realizaram-se cinco repetições da técnica nos mesmos casos. De acordo com as normas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil - MAPA, todos os animais positivos e seus parentes próximos no rebanho infectado foram sacrificados e necropsiados, e as amostras coletadas foram processadas da mesma forma que as biopsias.

RESULTADOS

Nas 318 amostras de biopsias analisadas, obteve-se 19 resultados positivos (5,98% dos ovinos) para PrP^{Sc} nos folículos de terceira pálpebra. Obtiveram-se folículos linfoides da mucosa retal em 263 biopsias (82,70% das coletas). Dessas amostras, nenhuma marcação positiva para PrP^{Sc} foi obtida no tecido linfoide da mucosa retal.

Baseando-se nos resultados das biopsias de terceira pálpebra, 18 animais positivos para scrapie (um animal positivo em biopsia não foi necropsiado pela morte no período entre a coleta e o abate) e 21 animais parentes jovens onde não foi feito o exame pré-clínico destes no rebanho, foram encaminhados para necropsia.

Os exames de IHQ, do material coletado no período *post mortem*, confirmaram os resultados anteriores pela biopsia de pálpebra dos 18 ovinos analisados (Quadro 1). Foi constatada pela observação de acúmulo granular de PrP^{Sc} no corpo de macrófagos dos centros germinativos dos folículos linfoides, com menor intensidade na área adjacente (Fig.4). Determinou-se com os resultados que 100% das terceiras pálpebras analisadas foram positivas para scrapie; 44,45% das tonsilas e 27,77% dos linfonodos mesentéricos também se apresentaram positivas. Não houve marcação positiva para PrP^{Sc} nas amostras de SNC e de tecido linfoide de mucosa retal de nenhum dos animais

necropsiados. Nas IHQ de 21 animais aparentados dos ovinos positivos para PrP^{Sc}, obteve-se resultado negativo em todos os exames. Em todas as cinco repetições feitas para cada biopsia positiva se obtiveram resultados positivos na imuno-histoquímica.

Quadro 1. Resultados imuno-histoquímicos para diagnóstico de PrP^{Sc} em diferentes tecidos coletado de ovinos por biopsia e após necropsia

	Amostras		Positivas		Negativas	
	Tecido	n	n	(%)	n	(%)
Biopsia	3ª pálpebra	318	19	(5,98)	299	(94,02)
	Mucosa retal	263	0	(0)	263	(100)
Necropsia						
Positivos por biopsia	3ª pálpebra	18	18	(100)	0	0
	Tonsila	18	8	(44,45)	10	(55,55)
	Linfonodo mesentérico	18	5	(27,77)	13	(72,23)
	Mucosa retal	18	0	(0)	18	(100)
	SNC	18	0	(0)	18	(100)
Negativos na biopsia	3ª pálpebra	21	0	(0)	21	(100)
	Tonsila	21	0	(0)	21	(100)
	Linfonodo mesentérico	21	0	(0)	21	(100)
	Mucosa retal	21	0	(0)	21	(100)
	SNC	21	0	(0)	21	(100)

DISCUSSÃO

A detecção do PrP^{Sc} no tecido linfoide é útil para a identificação precoce de ovinos afetados por scrapie durante a etapa pré-clínica da doença (González et al. 2008). As tonsilas, o tecido linfoide de terceira pálpebra e os linfonodos retrofaríngeos acumulam quantidades de PrP^{Sc} detectáveis por IHQ no início da infecção (Schreuder et al. 1996, O'Rourke et al. 1998, 2000) e são úteis para detectar animais portadores (Driemeier 2007). A coleta destes tecidos é adequada para realização de biopsias e exames *post mortem* de ovinos (O'Rourke et al. 2000, 2002). Estas áreas contêm um número maior de folículos linfáticos, o que as torna possíveis órgãos de eleição para avaliar ovinos sem sinais clínicos de scrapie, combinados com amostras coletadas a partir da medula oblonga, na região do óbex (Driemeier 2007). Conforme observado por Furr et al. (2011) e na IHQ realizada neste trabalho, a distribuição do PrP^{Sc} na zona dos centros

germinativos de folículos sugere também o envolvimento de células B em infecções priônicas.

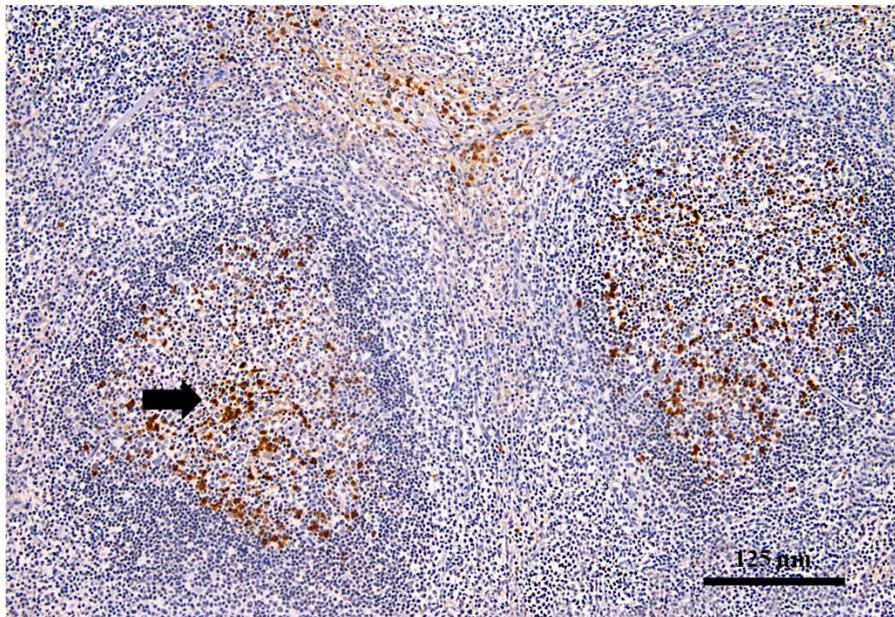


Fig.4. Preparação de imunohistoquímica para diagnóstico de scrapie, em corte histológico de terceira pálpebra de ovino. Folículo linfóide com intensa marcação positiva para PrP^{Sc} no centro germinativo (seta); Obj.20x.

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 (Van Keulen et al. 1996, Furr et al. 2011). De acordo com os resultados obtidos nas coletas realizadas na propriedade estudada, todas as amostras de terceira pálpebra foram positivas para scrapie, sem que os animais apresentassem sinais clínicos. A existência e as implicações das formas subclínicas da doença priônica têm sido discutidas, indicando que 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 ser assintomáticos com títulos de PrP^{Sc} no encéfalo e outros tecidos.

O aperfeiçoamento da utilização da terceira pálpebra em teste *ante mortem* para diagnóstico de scrapie e a identificação dos genótipos PrP de animais com doenças subclínica e clínica associadas com acúmulo PrP^{Sc}, disponibilizaram meios adicionais

para controlar a doença em populações ovinas na União Europeia. A estimativa da especificidade do teste de terceira pálpebra é de 100%; a sensibilidade estimada do teste é de 85 a 90% (O'Rourke et al. 2000).

Os resultados falso-negativos pela análise da mucosa retal são devidos a inúmeros fatores. Aleksandersen et al. (1991) relataram a localização agregada dos folículos linfoides entre pregas longitudinais, na mucosa retal, como uma das causas. Outra possibilidade para a dificuldade no diagnóstico seria a realização da coleta mais caudal à junção reto-anal, que diminui a quantidade de folículos obtidos nas biopsias (Dennis et al. 2009). Esses pontos são importantes, pois a coleta inadequada e em quantidade insuficiente é um limitador para o método de exame com biopsia da mucosa retal.

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, está associada com uma pequena amostra contendo folículos, o que reduz a probabilidade de se obter quantidades detectáveis de PrP^{Sc} e aumenta a probabilidade de resultados falso negativos. Nesse aspecto, os testes baseados em IHQ podem ser mais sensíveis e mais fáceis de interpretar, pois a visualização de folículos pode ser facilmente avaliada (Espenes et al. 2006) e a técnica detecta o príon mesmo em pequenas concentrações (Furr et al. 2011).

CONCLUSÕES

A utilização de tecidos linfoides no diagnóstico de scrapie por IHQ através de biopsias mostrou-se um método viável e eficaz para o diagnóstico pré-clínico.

Entre os órgãos analisados a terceira pálpebra apresentou-se como o principal tecido linfóide para confirmação da enfermidade por biopsia e no exame *post mortem*.

A identificação dos animais afetados no período pré-clínico é fundamental para o controle do scrapie, eliminando ovinos que poderiam ser potenciais fontes de infecção para outros animais no próprio ou em outros rebanhos.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio da pesquisa

(Proc.578226/2008-1, Proc. 505917/2008-4 e 500506/2011-6) e da bolsa de pós-doutorado (Proc.150903/2011-1).

REFERÊNCIAS

- Aleksandersen M., Nicander L. & Landsverk T. 1991. Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid follicles in the large intestine of sheep. *Dev. Comp. Immunol.* 15(4):413-422.
- Andréoletti O., Orge L., Benestad S.L., Beringue V., Litaise C., Simon S., Le Dur A., Laude H., Simmons H., Lugan S., Corbière F., Costes P., Morel N., Schelcher F. & Lacroux C. 2011. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog.* 7(2):e1001285.
- Billinis C., Panagiotidis C.H., Psychas V., Argyroudis S., Nicolaou A., Leontides S., Papadopoulos O. & Sklaviadis T. 2002. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J. Gen. Virol.* 83:713-721.
- Dennis M.M., Thomsen B.V., Marshall K.L., Hall S.M., Wagner B.A., Salman M.D., Norden D.K., Gaise C. & Sutton D.L. 2009. Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 70(1):63-72.
- Driemeier D. 2007. Scrapie, p.475-484. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. 3^aed. Pallotti, Santa Maria.
- Espenes A., Press C.M., Landsverk T., Tranulis M.A., Aleksandersen M., Gunnes G., Benestad S.L., Fuglesteit R. & Ulvund M.J. 2006. Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Pathol.* 134(2/3):115-125.
- Fraser H. 2000. Scrapie in sheep and goats, and related diseases, p.201-208. In: Martin W.B. & Aitken I.D. (Eds), *Diseases of Sheep*. 3rd ed. Blackwell Science, Oxford.
- Furr A., Knudsen D., Hildreth M.B. & Young A.J. 2011. Enhancement of immunohistochemical staining of scrapie proteins and immune cells within lymph nodes of early scrapie-infected sheep. *J. Immunol. Methods* 371(1/2):1-7.
- González L., Dagleish M.P., Martin S., Dexter G., Steele P., Finlayson J. & Jeffrey M. 2008. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet. Rec.* 162(13):397-403
- Hill A.F. & Collinge J. 2003. Subclinical prion infection. *Trends Microbiol.* 11(12):578-584.
- Hoinville L. 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.* 15(3):827-852.
- Hunter N. 1997. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and bse. *Trends Microbiol.* 5(8):331-334.

- Ikegami Y., Ito M., Isomura H., Momotani E., Sasaki K., Muramatsu Y., Ishiguro N. & Shinagawa M. 1991. Pre-clinical and clinical diagnosis of scrapie by detection of PrP protein in tissues of sheep. *Vet. Rec.* 128(12):271-275.
- Miller J.M., Jenny A.L., Taylor W.D., Marsh R.F., Rubenstein R. & Race R.E. 1993. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5:309-316.
- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Miller J.M., Spraker T.R., Sadler-Riggleman I. & Knowles D.P. 1998. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J. Clin. Microbiol.* 36(6):1750-1755.
- 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. 2000. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 38(9):3254-3259.
- 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. 2002. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(5):966-971.
- Prusiner S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216(4542):136-144.
- Prusiner S.B. 1995. The prion diseases. *Scient. Am.* 272:48-57.
- Race R. & Chesebro B. 1998. Scrapie infectivity found in resistant species. *Nature* 392(6678):770.
- Schreuder B.E.C., Van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M. & Smits, M.A. 1996. Preclinical test for prion diseases. *Nature* 381(6583):563.
- Schreuder B.E.C., Van Keulen L.J.M., Vromans M.E.W., Langeveld J.P.M. & Smits M.A. 1998. Tonsillar biopsy and PRPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet. Rec.* 142(21):564-568.
- Thackray A.M., Klein M.A., Aguzzi A. & Bujdoso R. 2002. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* 76(5):2510-2517.
- Van Keulen L.J.M., Schreuder B.E.C., Meloen R.H., Mooijharkes G., Vromans M.E.W. & Langeveld J.P.M. 1996. Immunohistochemical detection of prion proteins in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* 34(5):1228-1231.
- Wood J.L., Lund L.J. & Done S.H. 1992. The natural occurrence of scrapie in moufflon. *Vet. Rec.* 130(2):25-27.

3.2 Artigo 2

Diagnóstico de scrapie clássico em ovinos com genótipo ARR/ARR no Brasil

Juliano de Souza Leal, Caroline Pinto de Andrade,
Gabriel Laizola Frainer Correa, Gisele Silva Boos,
Matheus Viezzer Bianchi, Rui Fernando Felix Lopes e
David Driemeier

Artigo a ser submetido para a publicação na revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Diagnóstico de scrapie clássico em ovinos com genótipo ARR/ARR no Brasil¹

Juliano S. Leal², Caroline Pinto de Andrade², Gabriel Laizola Frainer Correa², Gisele Silva Boos², Matheus Viezzer Bianchi², Rui F. F. Lopes³ & David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Leal J.S., Andrade C.P., Correa G. L. F., Boos G.S., Bianchi M.V., Lopes R.F.F. & Driemeier D. 2013. [**Classical scrapie diagnosis in ARR/ARR sheep in Brazil.**] Diagnóstico de scrapie clássico em ovinos com genótipo ARR/ARR no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, , Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br.

Scrapie is a transmissible spongiform encephalopathy (TSE) that affects sheep and goats. Although many aetiology aspects related to the natural infection of scrapie remain unclear, the existence of an important genetic control about the disease incidence has been proposed, suggesting that it is essentially a genetic pathology. However, animal and herd trading between sheep farms is highly related to animal infected increase as well as susceptibility or scrapie resistance to classic scrapie. Mutations in three principal codons develop to risk of the disease deployment, mainly on codons 136, 154 and 171. This paper describes a classic scrapie outbreak in sheep flock of heterogeneous origin Suffolk from Valparaíso city, in São Paulo state, in Southeast Brazil. The immunohistochemistry (IHC) against prionic protein in lymphoreticular tissue in third eyelid and rectal biopsy was used to diagnosis, and blood sampling in 292 Suffolk sheep was performed for genotyping. Were observed ten scrapie positive animals, compatible with classic scrapie. Among this animals, two sheep have genotype ARR/ARR. The presence of positive animals of lower risk

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Av. Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, 91050-170, Brasil.

genotypes indicates that the susceptibility of this haplotype to classic scrapie agent is not absolute. Although these cases are rare, the scrapie occurrence is related to consortion of genetic and environmental factors in its natural host.

INDEX TERMS: Biopsy, scrapie, TSEs, immunohistochemistry.

RESUMO.- Scrapie é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET), que afeta ovinos e caprinos. Embora muitos aspectos referentes à etiologia da infecção natural do scrapie permaneçam obscuros, tem sido proposta a existência de um importante controle genético sobre a incidência da doença. Porém, o trânsito de animais ou rebanhos entre as propriedades de criação ovina está altamente relacionado ao aumento do número de animais infectados e também a susceptibilidade ou resistência ao scrapie natural ou clássico. Polimorfismos no gene de três códons principais estão relacionados ao risco de desenvolvimento da doença, principalmente nos códons 136, 154 e 171. Esse trabalho é o relato de um surto de scrapie clássico em rebanho ovino de animais misto Suffolk, de origem heterogênea, no município de Valparaíso, no Estado de São Paulo, na região Sudeste do Brasil. A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada para a identificação da proteína priônica em tecido linforreticular de biopsias de terceira pálpebra e mucosa retal e a coleta de amostra de sangue foi realizada para a genotipagem em 292 ovinos mistos da raça Suffolk, pertencentes a um rebanho de 811 animais. Entre os resultados obtidos no trabalho, foi observado o diagnóstico positivo para scrapie em 10 animais, compatível com scrapie clássico, sendo que dois deles apresentaram o genótipo ARR/ARR. A presença de animais positivos com genótipos de menor risco indica que a suscetibilidade deste haplótipo ao agente de scrapie clássico não é total. Apesar destes casos serem raros, a ocorrência de scrapie está relacionada à combinação de fatores genéticos e ambientais em seu hospedeiro natural.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Biopsia, scrapie clássico, EETs, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

Scrapie ou Tremor Epizoótico é uma encefalopatia espongiforme transmissível (EET)

que afeta ovinos e caprinos (Prusiner, 1995). Muitos aspectos referentes à etiologia da infecção natural do scrapie permanecem obscuros, porém tem sido proposta a existência de um importante controle genético sobre a incidência da doença, sugerindo que esta seja essencialmente genética (Groschup et al. 2007) A análise do gene PrP (proteína priônica ou *príon*) em ovinos de várias raças destacou uma interação entre o polimorfismo do genótipo do hospedeiro e a susceptibilidade ao agente infeccioso (Goldmann et al. 1991, 1994, Hunter et al. 1993, Foster et al., 1996, Bruce 2003). O trânsito de animais ou rebanhos entre as propriedades de criação ovina está associado ao aumento de animais infectados (Hoinville et al. 2000, McIntyre et al. 2006). Uma vez introduzida no rebanho, a doença pode ser transmitida tanto verticalmente, da mãe para o cordeiro, como horizontalmente para o rebanho (Dickinson et al. 1974, McIntyre et al. 2006, Touzeau et al. 2006). A transmissão horizontal é condição para a manutenção da doença dentro do rebanho (Hoinville 1996, Woolhouse et al. 1998). O risco de scrapie em ovelhas está ligado a alelos do gene PrP (Castiglioni et al. 1998, Dawson et al. 1998). A existência de animais com alto risco genético para scrapie em países livres da doença, sugere que esta seja causada por um agente infeccioso com susceptibilidade controlada pelo gene PRNP (Hunter et al. 1997). A doença é causada por cepas de príons que podem ser diferenciados umas das outras por características bioquímicas e biológicas (Davies & Kimberlin 1985).

Alguns polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) estão associadas com a susceptibilidade ou resistência ao scrapie clássico e envolvem principalmente os códons 136 (A ou V; alanina ou valina), 154 (R ou H; arginina ou histidina) e 171 (R, Q, ou H; arginina, glutamina ou histidina) (Elsen et al. 1999). Animais com genótipos V136R154Q171/VRQ, ARQ/VRQ, ARQ/ARQ e VRQ/ARH são mais suscetíveis à doença (Baylis et al. 2002). O diagnóstico de scrapie clássico em ovelhas com homozigose para o haplótipo A136R154R171 é raro (Groschup et al. 2007); este genótipo (ARR/ARR) foi assumido como o de menor risco, ou seja, um dos mais importantes em conferir resistência ao scrapie clássico em condições de exposição natural (Elsen et al. 1999). Entretanto, formas atípicas de scrapie, não obedecem este padrão de comportamento, apresentando condições bioquímicas e de transmissão diferentes (Benestad et al. 2003, Buschmann et al. 2004). Desta forma, o êxito na transmissão de príons para ovinos ARR/ARR mostrou que a resistência deste genótipo não era absoluta (Houston et al. 2003). A identificação de scrapie atípico em ovinos de

diferentes genótipos, incluindo ARR/ARR, reforçou esta afirmação (Buschmann et al. 2004). Por exemplo, a forma atípica Nor98 apresenta o genótipo ARR/ARR, mas no códon 141 expressa o aminoácido fenilalanina (F) ao invés de leucina (L), na forma L141F (Benestad et al. 2008); há o relato de que os códons 141(L/F) e 154 (R/H) estejam relacionados com a expressão da forma atípica (Moum et al. 2005). O presente trabalho relata a identificação de um surto de scrapie clássico em rebanho ovino de animais misto Suffolk, de origem heterogênea, na região Sudeste do Brasil, com o diagnóstico positivo para dois animais do genótipo ARR/ARR, cujo genótipo é compatível com scrapie clássico.

MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 2011, no município de Valparaíso, no Estado de São Paulo, um animal pertencente a um lote de 292 animais de um rebanho de 811 ovinos misto Suffolk, de ambos os sexos e diferentes idades, originários das regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil, foi diagnosticado para a forma clássica de scrapie. Uma vez que o diagnóstico foi obtido após a morte do animal, foi realizada a coleta de sangue para sequenciamento e genotipagem (para os códons 136, 141, 154 e 171) e coleta de biopsia de terceira pálpebra e mucosa retal para realização de imuno-histoquímica para scrapie, neste lote de 292 ovinos. Após a realização dos exames de imuno-histoquímica nestes animais, foi realizada uma nova coleta em 90 animais (cerca de 30% do rebanho original do lote). Estes animais foram sacrificados e necropsiados para coleta de amostras de tecido do cérebro (óbex), cerebelo, terceira pálpebra, mucosa retal, linfonodo mesentérico, tonsila palatínica e baço para imuno-histoquímica. Entre estes 90 animais estavam os que foram diagnosticados positivos para scrapie na coleta inicial e aqueles que apresentavam algum grau de parentesco com os animais positivos.

As amostras de tecido foram coletadas e processadas para a análise histológica e imuno-histoquímica para PrP^{Sc} 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). Os anticorpos monoclonais anti-príon F89/160.1.5 e F99/97.6.1 (DAKO Corp., Carpinteria, CA, EUA) foram acrescentados na diluição de 1:500 e os cortes foram incubados a 4°C em câmara úmida, por um período de 12 horas (Leal et al. 2012).

O sangue foi coletado por punção da veia jugular, utilizando EDTA como anti-coagulante e armazenado à -20°C, para posterior processamento. O DNA genômico dos ovinos foi extraído a partir de 500 µL de sangue total, utilizando o produto QIAmp® DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. A PCR foi realizada seguindo o protocolo de 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, utilizando: a amostra de DNA; 15 pmol de cada primer; tampão 1X PCR Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl; Invitrogen™, São Paulo, Brasil); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen™, São Paulo, Brasil); 200 µM de dNTP (Life Technologies™, Gaithersburg, MD, EUA); e 1U de enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, São Paulo, Brasil). Utilizou-se o primer forward para o códon 136 (5'-ATGAAGCATGTGGCAGGAGC-3') e o primer reverso do códon 171 (5'-GGTGACTGTGTGTTGCTTGACTG-3'), para amplificação de um fragmento de 245 bp, que contém as regiões dos principais códons analisados para suscetibilidade a scrapie (L'Homme et al. 2008).

O produto de PCR foi purificado e quantificado, respectivamente, com os reagentes comerciais Purelink® e Qubit® (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados 3 ng de DNA e 3,2 pmol de cada um dos primers anteriormente citados para o sequenciamento, utilizando o produto comercial BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA) e o equipamento ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, EUA).

RESULTADOS

Entre os 292 animais mistos Suffolk analisados por imuno-histoquímica, no tecido linforreticular da terceira pálpebra, 7 (2,4%) foram diagnosticados positivos para scrapie, durante a primeira coleta de material.

O resultado das análises imuno-histoquímicas realizadas após a necropsia dos 7 animais positivos submetidos à segunda coleta de tecido linforreticular e dos 83 animais com algum grau de parentesco com estes, confirmou os resultados positivos da primeira análise e apresentou mais 3 animais positivos. As amostras de 80 animais (89%) foram

negativas para o scrapie em todos os órgãos e tecidos avaliados e 10 animais (11%) foram positivos, apresentando reação imuno-histoquímica em um ou mais tecidos.

Todas as amostras dos animais necropsiados submetidas a imuno-histoquímica tiveram mais de três folículos linfoides analisados. As amostras positivas apresentaram diferenças quanto aos órgãos e tecidos reativos; nenhum animal foi positivo para scrapie em todos os tecidos e não houve reação positiva em nenhuma das amostras de linfonodo mesentérico e baço. A terceira pálpebra (Fig.1), juntamente com a tonsila palatínica (Fig.2), foram os tecidos que apresentaram maior porcentagem de amostras reativas (90%; 9/10 animais). Em apenas um animal, o tecido linfoide da mucosa retal foi reativo (10%; 1/10 animais); em nenhuma amostra, o resultado foi positivo no óbex. A Fig.3 mostra a coloração da reação de imuno-histoquímica com marcação positiva e a Fig.4 a coloração de hematoxila-eosina na mucosa retal de ovino.

A genotipagem para o códon 141 revelou homozigose para o aminoácido lisina (L141L ou L/L) em todos os 90 animais investigados. Os genótipos e as frequências dos alelos para os códons 136, 154 e 171, dos 90 animais investigados (10 animais positivos e 80 animais aparentados), submetidos à coleta de sangue para sequenciamento, são apresentados no Quadro 1.

Foram observados 4 dos 5 alelos do gene PRNP comumente encontrados em ovinos: ARR; ARQ; VRQ; e ARH. Em nenhum caso foi observado o alelo AHQ. Estas combinações alélicas formaram 6 haplótipos diferentes, entre os 15 possíveis: ARR/ARR; ARR/ARQ; ARH/ARH; ARQ/ARH; ARQ/ARQ; e ARQ/VRQ.

O haplótipo ARR/ARQ foi o mais frequente, presente em 39 amostras (43,3%), seguido pelos haplótipos ARQ/ARQ, em 34 amostras (37,7%), ARR/ARR, em 8 amostras (8,9%) e ARQ/ARH, em 5 amostras (5,6%). Os haplótipos ARH/ARH e ARQ/VRQ foram encontrados em 2 amostras cada (2,2%). Classificando os animais de acordo com os critérios de risco de susceptibilidade a scrapie, descritos por Dawson et al. (2008), observou-se que 8,9% do total de animais genotipados encontravam-se classificados no grupo de risco R1, mais resistentes e que não apresentam restrição para a reprodução. No grupo de risco R2, no qual os animais apresentam pouca resistência ao scrapie e necessitam de seleção cuidadosa quando utilizados para cruzamentos, foram observados 43,3% animais. No grupo de risco intermediário R3, foram observados 7,8% animais, e nos grupos R4 e R5, de animais geneticamente muito susceptíveis ao scrapie

e que não devem ser utilizados para reprodução, foram identificados 40% dos animais testados.

DISCUSSÃO

No hospedeiro, o agente PrP^{Sc} tem habilidades muito diferentes para multiplicar, manifestando um amplo espectro de variantes PrP (Baylis et al. 2002). 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 a ocorrência de uma única forma de príon de ovino, já que existem diversas cepas de príon que se distinguem pelas suas características patológicas e bioquímicas, podendo afetar de um modo diferente a cada animal de acordo com o seu genótipo (Hunter et al. 1992, Acín et al. 2004).

Entre os resultados deste trabalho foi possível observar que a frequência para o códon VRQ foi muito baixa (2,2%), confirmando as observações de que nesta raça há o predomínio dos alelos ARR e ARQ e, ocasionalmente o alelo ARH (Hunter et al. 1997, Dawson et al. 1998). A alta sensibilidade dos portadores do alelo VRQ em homozigose ou mesmo como haplótipos de ARQ, também se confirma na literatura (Groschup et al. 2007). Do ponto de vista epidemiológico, esta condição é preocupante quanto à susceptibilidade ao scrapie, uma vez que em raças como a Suffolk, o alelo VRQ é raro ou ausente, e neste trabalho esteve presente em dois animais, sendo um deles positivo.

A maioria dos dados epidemiológicos e genéticos recentemente coletados indica que ovinos portadores do haplótipo ARR/ARR são menos suscetíveis somente a infecções naturais de scrapie, enquanto que animais com VRQ em homozigose ou haplótipos ARQ são altamente suscetíveis (Groschup et al. 2007). Esta hipótese é apoiada por dados de genotipagem em milhares de ovinos com scrapie em todo mundo; entre estes dados há descrição de um caso de scrapie clássico em um ovino ARR/ARR, no Japão (Elsen et al. 1999). Este haplótipo é considerado o de menor sensibilidade ao scrapie clássico em todas as raças (Dawson et al. 2008, Eglin et al. 2005). Casos atípicos também foram encontrados em animais ARR/ARR (Buschmann et al. 2004,

Moum et al. 2005) e a sensibilidade de ovinos ARR/ARR frente a uma exposição oral foi relatada (Andreoletti et al. 2006).

Polimorfismos nas posições dos códons 136, 154 e 171 não são os únicos associados à resistência ou suscetibilidade a scrapie (Laegreid et al. 2008). Uma análise feita na variação dos códons 136 e 171, revela que cada um tem vários sítios polimórficos adjacentes e podem codificar até quatro aminoácidos (Vaccari et al. 2004, Benkel et al. 2007). A forma atípica do príon, caracterizada pela cepa Nor98 (Benestad et al. 2008), é mais frequentemente encontrada em animais AHQ portadores de um polimorfismo no códon 141, ainda não descrita no Brasil para a raça Suffolk (Andrade et al. 2011). Esta forma atípica expressa o aminoácido fenilalanina (F) ao invés de leucina (L), na forma L141F (Benestad et al. 2008).

Em rebanhos franceses, considerando os códons 136, 141, 156 e 171, a prevalência estimada para scrapie atípico em populações homogêneas ALRR/ALRR equivale à cerca de 6 casos por 10.000 testes (Fediaevsky et al. 2010a) e para o restante da Europa a epidemiologia mostra que o tremor epizoótico atípico está presente em cerca de 1/10.000 da população de ovinos, independentemente da presença simultânea de tremor epizoótico clássico (Everest et al. 2006). Apesar da baixa prevalência de scrapie atípico em animais ALRR/ALRR, a probabilidade de detectar um caso positivo não é insignificante quando o número de animais testados é elevado. Fazendas engajadas em seleção de animais ALRR/ALRR tendem a testar um maior número de animais, devido à participação em programas de certificação de scrapie (Fediaevsky et al. 2008; Cazeau et al. 2008; McIntyre et al. 2008).

Entretanto, embora seja geralmente aceito que o scrapie clássico seja uma doença infecciosa e contagiosa (Detwiler & Baylis, 2003), o contágio de scrapie atípico é questionado, pelo fato do marcador específico para a forma atípica da doença ser detectado fora do sistema nervoso central (Benestad et al. 2003; Hopp et al. 2006; Fediaevsky et al. 2010b), mesmo em casos transmitidos experimentalmente para ratos transgênicos (Le Dur et al. 2005) e ovelhas (Simmons et al. 2007). Além disso, a maioria dos casos de scrapie atípico é observada em animais com genótipos de baixa suscetibilidade ao scrapie clássico. Vários estudos têm demonstrado que a susceptibilidade à forma atípica está altamente associada com códons PrP 141 (L/F) e 154 (R/H) (Moum et al. 2005; Benestad et al. 2008). Na verdade, estudos apontam para a hipótese de que o scrapie atípico possa se desenvolver na ausência à exposição ao

agente infeccioso (Benestad et al. 2003; Hopp et al. 2006; Fediaevsky et al. 2009; Simmons et al. 2009), dado o limitado conhecimento sobre a fisiopatologia da forma atípica (Fediaevsky et al. 2010a).

Neste trabalho dois (2/8) animais positivos para scrapie apresentaram o haplótipo ARR/ARR, considerado o de maior resistência à doença. Entretanto, estes animais, da mesma forma que todos os genotipados, não apresentavam alteração do aminoácido lisina no códon 141, que, quando alterado (quando substituído por fenilalanina), comprovadamente está relacionado à atipicidade em ovinos Suffolk (Benestad et al. 2008). Desta forma, estes dois animais ARR/ARR positivos não se enquadram nas características genotípicas dos ovinos considerados como portadores da forma atípica de scrapie. Possivelmente, o fato de existirem muitos animais oriundos de diversas propriedades e originários de cruzamentos de raças, caracterizando a formação de um rebanho heterogêneo, tenha propiciado as condições para uma propagação da doença, com a infecção de animais do grupo de maior resistência. Tem sido descrito que a introdução de ovinos adultos e livres de scrapie em rebanhos contaminados possibilita a transmissão lateral, mesmo em animais adultos (Ryder et al. 2004), apesar de animais jovens serem mais susceptíveis (O'Rourke et al. 2002).

CONCLUSÕES

O diagnóstico dos dois animais ARR/ARR positivos indica que a resistência deste genótipo ao agente de scrapie clássico não é total. Embora estes casos de infecções sejam considerados raros, eles sustentam a idéia de que a ocorrência de scrapie envolve uma combinação de fatores infecciosos, abrigando propriedades biológicas e bioquímicas diferentes em seu hospedeiro natural.

REFERÊNCIAS

- Acín C., Martín-Burriel I., Goldmann W., Lyahyai J., Monzón M., Bolea R., Smith A., Rodellar C., Badiola J.J. & Zaragoza P. 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J. Gen. Virol.* 85(7):2103-2110.
- Andrade C.A., Almeida L.L., Castro L.A., Leal J.S., Silva S.C. & Driemeier D. 2011. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):893-898.

- Andreoletti O., Morel N., Lacroux C., Rouillon V., Barc C., Tabouret G., Sarradin P., Berthon P., Bernardet P., Mathey J., Lugan S., Costes P., Corbière F., Espinosa J.C., Torres J.M., Grassi J., Schelcher F. & Lantier F. 2006. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J Gen Virol.* 87(4):1043–1046.
- Baylis M., Goldmann W., Houston F., Cairns D., Chong A., Ross A., Smith A., Hunter N. & McLean A.R. 2002. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *J. Gen. Virol.* 83(11):2907-2914.
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schonheit J., Tranulis M.A. & Bratberg B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec.* 153(7):202-208.
- Benestad S.L., Arzac J.N., Goldmann W. & Noremark M. 2008. Atypical/Nor98 scrapie:properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet.Res.* 39(4):19.
- Benkel B.F., Valle E., Bissonnette N. & Hossain Farid A. 2007. Simultaneous detection of eight single nucleotide polymorphisms in the ovine prion protein gene. *Mol. Cell. Probes* 21(5-6):363-367.
- Bossers A., Belt P.B.G.M., Raymond G. J., Caughey B., De Vries R. & Smits M.A. 1997. Scrapie susceptibility linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(10):4931-4936.
- Bossers A., De Vries R. & Smits M.A. 2000. Susceptibility of sheep for scrapie as assessed by in vitro conversion of nine naturally occurring variants of PrP. *J. Virol.* 74(3):1407-1414.
- Bruce ME. 2003. TSE strain variation. *Br. Med. Bull.* 66:99-108.
- Buschmann A., Biacabe A.G., Ziegler U., Bencsik A., Madec J.Y., Erhardt G., Lühken G., Baron T. & Groschup M.H. 2004. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Methods* 117(1):27-36.
- Castiglioni B., Comincini S., Drisaldi B., Motta T. & Ferretti L. 1998. Comparative mapping of the prion gene (PRNP) locus in cattle, sheep and human with PCR generated probes. *Mamm. Genome* 9(10):853-855.
- Cazeau G., Fediaevsky A. & Calavas D. 2008. Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006. *Revue Méd. Vét.* 159(6):348-356.
- Davies D.C. & Kimberlin R.H. 1985. Selection of Swaledale sheep of reduced susceptibility to experimental scrapie. *Vet. Rec.* 116(8):211-214.
- Dawson M., Hoinville L.J., Hosie B.D. & Hunter N. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet. Rec.* 142(23):623-625.
- Dawson M., Moore R.C. & Bishop S.C. 2008. Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet. Res.* 39:25.

- Detwiler L.A. & Baylis M. 2003. The epidemiology of scrapie. *Rev. Sci. Tech.* 22(1):121-143.
- Dickinson A.G., Stamp J.T. & Renwick C.C. 1974. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.* 84(1):19-25.
- Eglin R.D., Warner R., Gubbins S., Sivam S.K. & Dawson M. 2005. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. *Vet. Rec.* 156(14):433-437.
- Elsen J.M., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eychenne F., Khang J.V., Poivey J.P., Lantier F. & Laplace J.L. 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* 144(3):431-445.
- Espenes A., Press C.M.C.L., Landsverk T., Tranulis M.A., Aleksandersen M., Gunnes G., Benestad S.L., Fuglestad R. & Ulvund M.J. 2006. Detection of PrPSc in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Pathol.* 134(2-3):115-125.
- Everest S.J., Thorne L., Barnicle D.A., Edwards J.C., Elliott H., Jackman R. & Hope J. 2006. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. *J. Gen. Virol.* 87: 471-477.
- Fediaevsky A., Tongue S.C., Nöremark M., Calavas D., Ru G. & Hopp P. 2008. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet. Res.* 4:19.
- Fediaevsky A., Morignat E., Ducrot C. & Calavas D. 2009. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerg. Infect. Dis.* 15(5):710-718.
- Fediaevsky A., Calavas D., Gasqui P., Mozami-Goudarzi K., Laurent P., Arsac J.N., Ducrot C., Moreno C. 2010a. Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie. *Genet. Sel. Evol.* 42:14.
- Fediaevsky A., Gasqui P., Calavas D. & Ducrot C. 2010b. Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. *Vet. J.* 185(3):338-340.
- Foster J.D., Wilson M. & Hunter N. 1996. Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet. Rec.* 139(21):512-515.
- Goldmann W., Hunter N., Benson G., Foster J.D. & Hope J. 1991. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *J. Gen. Virol.* 72(10):2411-2417.
- Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J. & Hope J. 1994. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol.* 75(5):989-995.
- Groschup M.H., Lacroux C., Buschmann A., Lühken G., Mathey J., Eiden M., Luga S., Hoffmann C., Espinosa J.C., Baron T., Torres J.M., Erhardt G. & Andreoletti O. 2007. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg. Infect. Dis.* 13(8):1201-1207.

- Hoinville L.J. 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev. Sci. Tech.* 15(3):827-852.
- Hoinville L.J., Hoek A., Gravenor M.B. & McLean A.R. 2000. Descriptive epidemiology of scrapie in Great Britain: results of a postal survey. *Vet. Rec.* 146(16):455-461.
- Hopp P., Omer M.K. & Heier B.T. 2006. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J. Gen. Virol.* 87(12):3729-3736.
- Houston F., Goldmann W., Chong A., Jeffrey M., Gonzalez L., Foster J., Parnham D. & Hunter N. 2003. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. *Nature* 423(6939):498.
- Hunter N., Foster J.D. & Hope J. 1992. Natural scrapie in British sheep: breeds, ages and PrP gene polymorphisms. *Vet. Rec.* 130(18):389-392.
- Hunter N., Goldmann W., Benson G., Foster J.D. & Hope J. 1993. Swaledale sheep affected by natural scrapie differ significantly in PrP genotype frequencies from healthy sheep and those selected for reduced incidence of scrapie. *J. Gen. Virol.* 74(6):1025-1031.
- Hunter N., Cairns D., Foster J.D., Smith G., Goldmann W. & Donnelly K. 1997. Is scrapie solely a genetic disease? *Nature* 386(6621): 137.
- Laegreid W.W., Clawson M.L., Heaton M.P., Green B.T., O'Rourke K.I. & Knowles D.P. 2008. Scrapie resistance in ARQ sheep. *J. Virol.* 82(20):10318-10320.
- Leal J.S., Correa G.L.F., Dalto A.G.C., Boos G.S., Oliveira E.C., Bandarra P.M., Lopes R.F.F. & Driemeier D. 2012. Utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 32(10):990-994.
- Le Dur A., Béringue V., Andréoletti O., Reine F., Lai T.L., Baron T., Bratberg B., Vilotte J.L., Sarradin P., Benestad S.L. & Laude H. 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(44):16031-16036.
- L'Homme Y., Leboeuf A. & Cameron J. 2008. PrP genotype frequencies of Quebec sheep breeds determined by real-time PCR and molecular beacons. *Can. J. Vet. Res.* 72(4):320-324.
- McIntyre K.M., Gubbins S., Sivam S.K. & Baylis M. 2006. Flock-level risk factors for scrapie in Great Britain: analysis of a 2002 anonymous postal survey. *BMC Vet. Res.* 2:25.
- McIntyre K.M., Del Rio Vilas V.J. & Gubbins S. 2008. No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. *BMC Vet. Res.* 4:13.
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T. & Benestad S.L. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.* 86(1):231-235.
- 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. 2002. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9(5):966-971.

- Prusiner S.B. 1995. The prion diseases. *Sci. Am.* 272(1):48-57.
- Ryder S., Dexter G., Bellworthy S. & Tongue S. 2004. Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res. Vet. Sci.* 76(3): 211-217.
- Simmons M.M., Konold T., Simmons H.A., Spencer Y.I., Lockey R., Spiropoulos J., Everitt S. & Clifford D. 2007. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet. Res.* 3:20.
- Simmons H.A., Simmons M.M., Spencer Y.I., Chaplin M.J., Povey G., Davis A., Ortiz-Pelaez A., Hunter N., Matthews D. & Wrathall A.E. 2009. Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie. *BMC Vet. Res.* 5:8.
- Touzeau S., Chase-Topping M.E., Matthews L., Lajous D., Eychenne F., Hunter N., Foster J.D., Simm G., Elsen J.M. & Woolhouse M.E. 2006. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. *Arch. Virol.* 151(4):735-751.
- Vaccari G., Conte M., Morelli L., Di Guardo G., Petraroli R. & Agrimi U. 2004. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. *Mol. Cell. Probes* 18(1):33-37.
- Woolhouse M.E., Stringer S.M., Matthews L., Hunter N. & Anderson R.M. 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proc. Biol. Sci.* 265(1402):1205-1210.

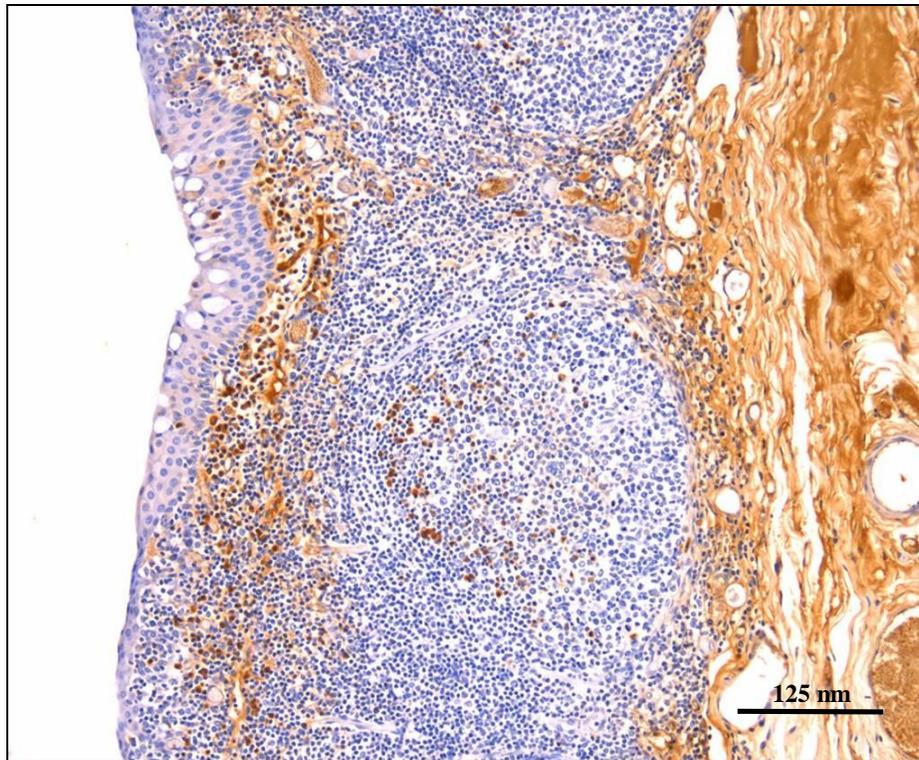


Fig.1. Imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie, em corte histológico de terceira pálpebra de ovino. Folículo linfoide com marcação positiva para PrP^{Sc} no centro germinativo; Obj.20x.

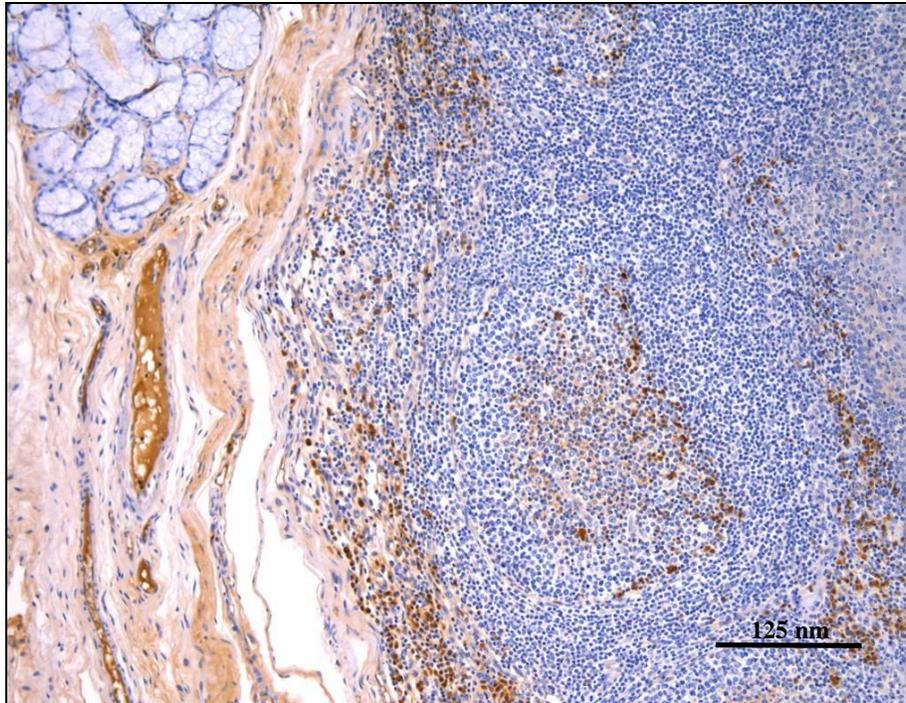


Fig.2. Imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie, em corte histológico de tonsila palatínica de ovino. Folículo linfoide com marcação positiva para PrP^{Sc} o centro germinativo; Obj.20x.

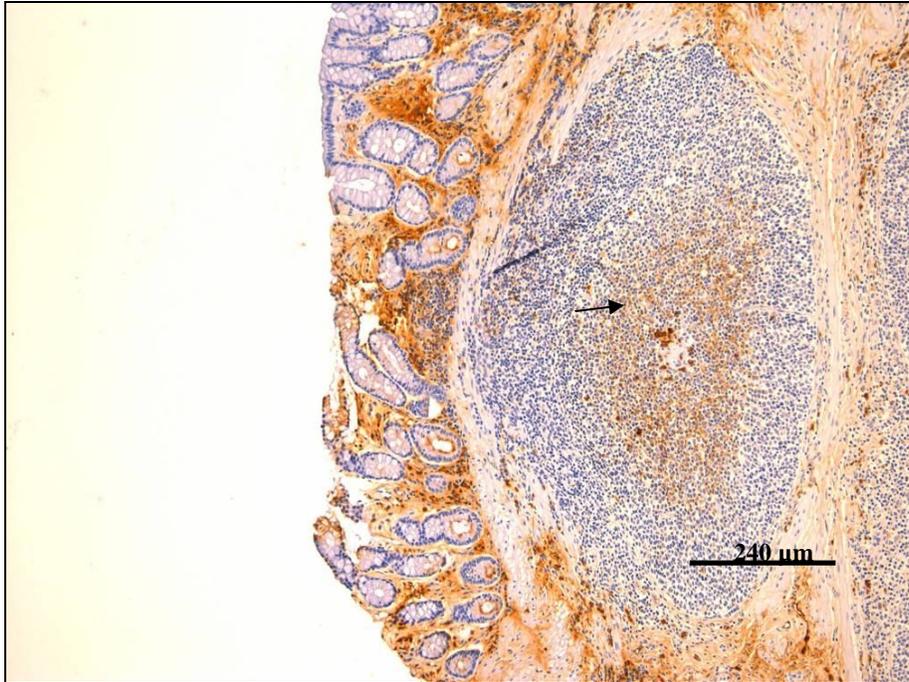


Fig.3. Imuno-histoquímica para diagnóstico de scrapie, em corte histológico de mucosa retal de ovino. Folículo linfóide com marcação positiva para PrP^{Sc} o centro germinativo (seta); Obj.10x.

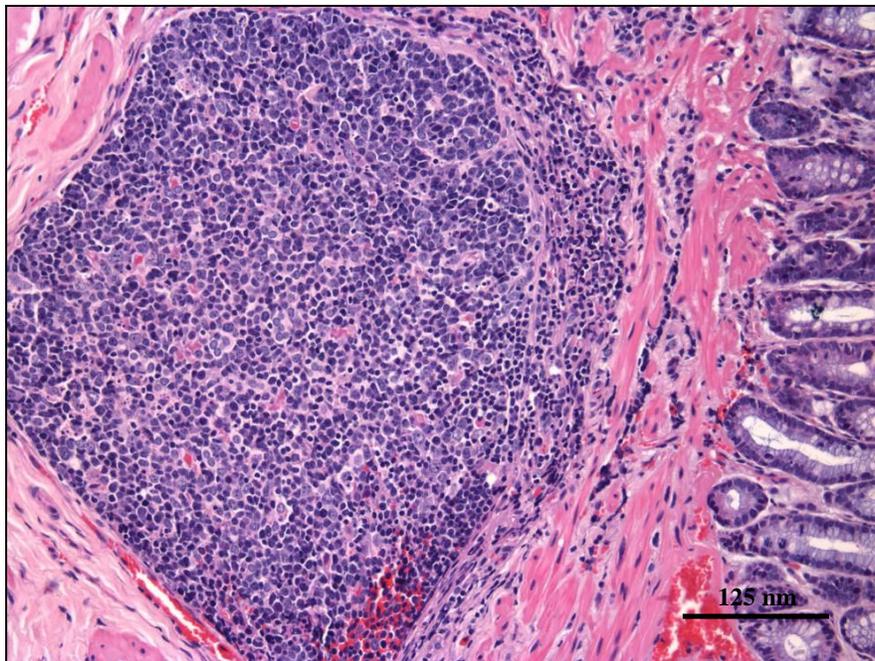


Fig.4. Corte histológico de mucosa retal de ovino mostrando um folículo linfóide. HE, Obj.20x.

Quadro 1. Resultado da imuno-histoquímica de acordo com o genótipo para os códons 136, 154 e 171 e grau de risco ao scrapie de 90 ovinos da raça Suffolk

Genótipo	Animais n	Risco	Imuno-histoquímica	
			Positivo n (%)	Negativo n (%)
ARR/ARR	8	R1	2 (2,2%)	6 (6,7%)
ARR/ARQ	39	R2	2 (2,2%)	37 (41,1%)
ARH/ARH	2	R3	1 (1,1%)	1 (1,1%)
ARQ/ARH	5	R3	0 -	5 (5,6%)
ARQ/ARQ	34	R4	4 (4,4%)	30 (33,3%)
ARQ/VRQ	2	R5	1 (1,1%)	1 (1,1%)
Total	90	-	10 (11,1%)	80 (88,9%)

4 CONCLUSÕES

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

- a técnica de imuno-histoquímica realizada mostrou-se comprovadamente eficiente para o diagnóstico de príon PrP^{Sc} em tecido linforreticular de ovinos e caprinos;

- a utilização da técnica de genotipagem para o auxílio no diagnóstico de scrapie mostrou-se importante e necessária, e sua associação à técnica de imuno-histoquímica é uma ferramenta importante para um direcionamento epidemiológico;

- o diagnóstico de animais de risco 1 positivos em imuno-histoquímica indica que a resistência deste genótipo ao agente de scrapie clássico não é total;

- a ocorrência de scrapie envolve uma combinação de fatores infecciosos, abrigando propriedades biológicas e bioquímicas diferentes em seu hospedeiro natural.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACÍN, C.; MARTÍN-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, n.7, p.2103-2110, 2004.
- ACUTIS, P.L.; BOSSERS, A.; PRIEM, J.; RIINA, M.V.; PELETTO, S.; MAZZA, M.; CASALONE, C.; FORLONI, G.; RU, G.; CARAMELLI, M. Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. **Journal of General Virology**. v.87, p.1029-1033, 2006.
- 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, n.4, p.413-422, 1991.
- ANDRADE, C.A.; ALMEIDA, L.L.; CASTRO, L.A.; LEAL, J.S.; SILVA, S.C.; DRIEMEIER, D. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.10, p.893-898, 2011.
- ANDREOLETTI, O.; MOREL, N.; LACROUX, C.; ROUILLON, V.; BARC, C.; TABOURET, G.; SARRADIN, P.; BERTHON, P.; BERNARDET, P.; MATHEY, J.; LUGAN, S.; COSTES, P.; CORBIÈRE, F.; ESPINOSA, J.C.; TORRES, J.M.; GRASSI, J.; SCHELCHER, F.; LANTIER, F. Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. **Journal of General Virology**. v.87, n.4, p.1043-1046, 2006.
- ANDRÉOLETTI, O.; ORGE, L.; BENESTAD, S.L.; BERINGUE, V.; LITAISE, C.; SIMON, S.; LEDUR, A.; LAUDE, H.; SIMMONS, H.; LUGAN, S.; CORBIÈRE, F.; COSTES, P.; MOREL, N.; SCHELCHER, F.; LACROUX, C. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. **PloS Pathogens**. v.7, n.2, p.e1001285, 2011.
- BARILLET, F.; MARIAT, D.; AMIGUES, Y.; FAUGERAS, R.; CAILLAT, H.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; RUPP, R.; BABILLIOT, J.M.; LACROUX, C.; LUGAN, S.; SCHELCHER, F.; CHARTIER, C.; CORBIÈRE, F.; ANDREOLETTI, O.; PERRIN-CHAUVINEAU, C. Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie. **Journal of General Virology**. v.90, p.769-776, 2009.
- BAYLIS, M.; GOLDMANN, W.; HOUSTON, F.; CAIRNS, D.; CHONG, A.; ROSS, A.; SMITH, A.; HUNTER, N.; McLEAN, A.R. Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. **Journal of General Virology**. v.83, n.11, p.2907-2914, 2002.
- 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.
- BENESTAD, S.L.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHONHEIT, J.; TRANULIS, M.A.; BRATBERG, B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. **Veterinary Record**. v.153, n.7, p.202-208, 2003.
- BENESTAD, S.L.; ARSAC, J.N.; GOLDMANN, W.; NOREMARK, M. Atypical/Nor98 scrapie:properties of the agent, genetics, and epidemiology. **Veterinary Research**. v.39, n.4, p.19, 2008.
- BENKEL, B.F.; VALLE, E.; BISSONNETTE, N.; HOSSAIN FARID, A. Simultaneous detection of eight single nucleotide polymorphisms in the ovine prion protein gene. **Molecular and Cellular Probes**. v.21, n.5-6, p.363-367, 2007.
- BILLINIS, C.; PANAGIOTIDIS, C.H.; PSYCHAS, V.; ARGYROUDIS, S.; NICOLAOU, A.; LEONTIDES, S.; PAPADOPOULOS, O.; SKLAVIADIS, T. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. **Journal of General Virology**. v.83, p.713-721, 2002.
- 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, n.10, 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, 1994.
- 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.

- BRUCE, M.E. TSE strain variation. **British Medical Bulletin**. v.66, p.99-108, 2003.
- BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.G.; ZIEGLER, U.; BENCSIK, A.; MADEC, J.Y.; ERHARDT, G.; LÜHKEN, G.; BARON, T.; GROSCHEP, M.H. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. **Journal of Virological Methods**. v.117, n.1, p.27-36, 2004.
- 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, n.10, p.853-855, 1998.
- CAZEAU, G., FEDIAEVSKY, A.; CALAVAS, D. Prévalence des formes classique et atypique de tremblante chez les petits ruminants en France entre 2002 et 2006. **Revue de Médecine Vétérinaire**. v.159, n.6, p.348-356, 2008.
- 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.
- COLUSSI, S.; VACCARI, G.; RASERO, R.; MARONI PONTI, A.; RU, G.; SACCHI, P. Prospects for applying breeding for resistance to control scrapie in goats: the current situation in Italy. **Small Ruminant Research**. v.88, n. 2-3, p.97-101, 2010.
- DAVIES, D.C.; KIMBERLIN, R.H. Selection of Swaledale sheep of reduced susceptibility to experimental scrapie. **Veterinary Record**. v.116, n.8, p.211-214, 1985.
- DAWSON, M. Approaches for breeding for resistance - the GB experience. In: INTERNATIONAL CONFERENCE - PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, London, 2006. **Abstracts...** London: Veterinary Laboratory Agency, 2006. p. 27.
- DAWSON, M.; HOINVILLE, L.J.; HOSIE, B.D.; HUNTER, N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. **Veterinary Record**. v.142, n.23, p.623-625, 1998.
- DAWSON, M.; MOORE, R.C.; BISHOP, S.C. Progress and limits of PrP gene selection policy. **Veterinary Record**. v.39, p.25, 2008.
- DEBEER, S.O.S.; BARON, T.G.M.; BENCSIK, A.A. Immunohistochemistry of PrP^{Sc} within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v.49, p.1519-1524, 2001.
- DENNIS, M.M.; THOMSEN, B.V.; MARSHALL, K.L.; HALL, S.M.; WAGNER, B.A.; SALMAN, M.D.; NORDEN, D.K.; GAISE, C.; SUTTON, D.L. Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. **American Journal of Veterinary Research**. v.70, n.1, p.63-72, 2009.

- DETWILER, L.A.; BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie. **Revue Scientifique et Technique**. v.22, n.1, p.121-143, 2003.
- DICKINSON, A.G.; STAMP, J.T.; RENWICK, C.C. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. **Journal of Comparative Pathology**. v.84, n.1, p.19-25, 1974.
- DRIEMEIER, D. Scrapie. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R. (Eds). **Doenças de ruminantes e equídeos**. 3ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.475-484.
- EGLIN, R.D.; WARNER, R.; GUBBINS, S.; SIVAM, S.K.; DAWSON, M. Frequencies of PrP genotypes in 38 breeds of sheep sampled in the National Scrapie Plan for Great Britain. **Veterinary Record**. v.156, n.14, p.433-437, 2005.
- ELSEN, J.M.; AMIGUES, Y.; SCHELCHER, F.; DUCROCQ, V.; ANDREOLETTI, O.; EYCHENNE, F.; KHANG, J.V.; POIVEY, J.P.; LANTIER, F.; LAPLACE, J.L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. **Archives of Virology**. v.144, n.3, p.431-445, 1999.
- ERSDAL, C.; SIMMONS, M.M.; GOODSIR, C.; MARTIN, S.; JEFFREY, M. Sub-cellular pathology of scrapie: coated pits are increased in PrP codon 136 alanine homozygous scrapie-affected sheep. **Acta Neuropathologica**. v.106, p.17-28, 2003.
- ESPENES, A.; PRESS, C.M.C.L.; LANDSVERK, T.; TRANULIS, M.A.; ALEKSANDERSEN, M.; GUNNES, G.; BENESTAD, S.L.; FUGLESTVEIT R., ULVUND, M.J. Detection of PrPSc in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. **Journal of Comparative Pathology**. v.134, n.2-3, p.115-125, 2006.
- EVEREST, S.J.; THORNE, L.; BARNICLE, D.A.; EDWARDS, J.C.; ELLIOTT, H.; JACKMAN, R.; HOPE, J. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie-surveillance programme. **Journal of General Virology**. v.87, p.471-477, 2006.
- FEDIAEVSKY, A.; TONGUE, S.C.; NÖREMARK, M.; CALAVAS, D.; RU, G.; HOPP, P. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. **BMC Veterinary Research**. v.4, p.19, 2008.
- FEDIAEVSKY, A.; MORIGNAT, E.; DUCROT, C.; CALAVAS, D. A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. **Emerging Infectious Diseases**. v.15, n.5, p.710-718, 2009.
- FEDIAEVSKY, A.; CALAVAS, D.; GASQUI, P.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; LAURENT, P.; ARSAC, J.N.; DUCROT, C.; MORENO, C. Quantitative estimation of genetic risk for atypical scrapie in French sheep and potential consequences of the current breeding programme for resistance to scrapie on the risk of atypical scrapie. **Genetics Selection Evolution**. v.42, p.14, 2010a.
- FEDIAEVSKY, A.; GASQUI, P.; CALAVAS, D.; DUCROT, C. Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks

- under French TSE control measures. **The Veterinary Journal**. v.185, n.3, p.338-340, 2010b.
- 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, n.21, p.512-515, 1996.
- FRASER, H. Scrapie in sheep and goats, and related diseases. In: MARTIN, W.B.; AITKEN, I.D. (Eds). **Diseases of sheep**. 3ed. Oxford: Blackwell Science, 2000. p.201-208.
- FURR, A.; KNUDSEN, D.; HILDRETH, M.B.; YOUNG, A.J. Enhancement of immunohistochemical staining of scrapie proteins and immune cells within lymph nodes of early scrapie-infected sheep. **Journal of Immunological Methods**. v.371, p.1-7, 2011.
- 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.
- 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, n.10, 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, n.5, p.989-995, 1994.
- GOLDMANN, W.; MARTIN, T.; FOSTER, J.; HUGHES, S.; SMITH, G.; HUGHES, K.; DAWSON, M.; HUNTER, N. Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. **Journal of General Virology**. v.77, n.11, p. 2885-2891, 1996.
- GONZALEZ, L.; MARTIN, S.; BEGARA-MCGORUM, I.; HUNTER, N.; HOUSTON, F.; SIMMONS, M.; JEFFREY, M. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. **Journal of Comparative Pathology**. v.126, p.17-29, 2002.
- GONZÁLEZ, L.; DAGLEISH, M.P.; MARTIN, S.; DEXTER, G.; STEELE, P.; FINLAYSON, J.; JEFREY, M. Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. **Veterinary Record**. v.162, p.397-403, 2008.
- 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.
- GROSCHUP, M.H.; LACROUX, C.; BUSCHMANN, A.; LÜHKEN, G.; MATHEY, J.; EIDEN, M.; LUGAN, S.; HOFFMANN, C.; ESPINOSA, J.C.; BARON, T.; TORRES, J.M.; ERHARDT, G.; ANDREOLETTI, O. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. **Emerging Infectious Diseases**. v.13, n.8, p.1201-1207, 2007.
- HADLOW, W.J. Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. **Veterinary Pathology**. v.36, p. 523-52, 1999.
- 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.
- HOINVILLE, L.J. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. **Revue Scientifique et Technique**. v.15, n.3, p.827-852, 1996.
- HOINVILLE, L.J.; HOEK, A.; GRAVENOR, M.B.; McLEAN, A.R. Descriptive epidemiology of scrapie in Great Britain: results of a postal survey. **Veterinary Record**. v.146, n.16, p.455-461, 2000.
- HOPP, P.; OMER, M.K.; HEIER, B.T. A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. **Journal of General Virology**. v.87, n.12, p.3729-3736, 2006.
- HOUSTON, F.; GOLDMANN, W.; CHONG, A.; JEFFREY, M.; GONZALEZ, L.; FOSTER, J.; PARNHAM, D.; HUNTER, N. Prion diseases: BSE in sheep bred for resistance to infection. **Nature**. v.423, n.6939, p.498, 2003.
- 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, n.18, p.389-392, 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, n.6, 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.; CAIRNS, D.; FOSTER, J.D.; SMITH, G.; GOLDMANN, W.; DONNELLY, K. Is scrapie solely a genetic disease? **Nature**. v.386, n.6621, p. 137, 1997.
- 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, n.12, p.271-275, 1991.
- JEFFREY, M.; GONZÁLEZ, L. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v.33, n.4, p. 373-394, 2007.
- LAEGREID, W.W.; CLAWSON, M.L.; HEATON, M.P.; GREEN, B.T.; O'ROURKE, K.I.; KNOWLES, D.P. Scrapie resistance in ARQ sheep. **Journal of Virology**. v.82, n.20, p.10318-10320, 2008.
- LEAL, J.S.; CORREA, G.L.F.; DALTO, A.G.C.; BOOS, G.S.; OLIVEIRA, E.C.; BANDARRA, P.M.; LOPES, R.F.F.; DRIEMEIER, D. Utilização de biopsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de scrapie em uma propriedade da Região Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, n.10, p.990-994, 2012.
- LE DUR, A.; BERINGUE, V.; ANDREOLETTI, O.; REINE, F.; LAI, T.L.; BARON, T.; BRATBERG, B.; VILOTTE, J.L.; SARRADIN, P.; BENESTAD, S.L.; LAUDE, H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v.102, n.44, p.16031-16036, 2005.
- 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.
- LIGIOS, C.; JEFFREY, M.; RYDER, S.J.; BELLWORTHY, S.J.; SIMMONS, M.M. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. **Journal of Comparative Pathology**. v.127, p. 45-57, 2002.
- LIGIOS, C.; DEXTER, G.; SPIROPOULOS, J.; MAESTRALE, C.; CARTA, A.; SIMMONS, M.M. Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. **Journal of Comparative Pathology**. v.131, p. 271-276, 2004.

- LIMA, A.C.B.; BOSSERS, A.; SOUZA, C.E.A.; OLIVEIRA, S.M.P.; OLIVEIRA, D.M. PrP genotypes in a pedigree flock of Santa Inês sheep. **Veterinary Record**. v.160, p. 33-337, 2007.
- L'HOMME, Y.; LEBOEUF, A.; CAMERON, J. PrP genotype frequencies of Quebec sheep breeds determined by real-time PCR and molecular beacons. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.72, n.4, p.320-324, 2008.
- 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.
- MARTIN, S.; GONZALEZ, L.; CHONG, A.; HOUSTON, F. E.; HUNTER, N.; JEFFREY, M. Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. **Journal of General Virology**. v 86, p. 839-848, 2005.
- McINTYRE, K.M.; GUBBINS, S.; SIVAM, S.K.; BAYLIS, M. Flock-level risk factors for scrapie in Great Britain: analysis of a 2002 anonymous postal survey. **BMC Veterinary Research**. v.2, p.25, 2006.
- McINTYRE, K.M.; DEL RIO VILAS, V.J.; GUBBINS, S. No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. **BMC Veterinary Research**. v.4, p.13, 2008.
- MILLER, J.M.; JENNY, A.L.; TAYLOR, W.D.; MARSH, R.F.; RUBENSTEIN, R.; RACE, R.E. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.5, p.309-316, 1993.
- MOUM, T.; OLSAKER, I.; HOPP, P.; MOLDAL, T.; VALHEIM, M.; MOUM, T.; BENESTAD, S.L. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. **Journal of General Virology**. v.86, n.1, p.231-235, 2005.
- 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, n.6, p.1750-1755, 1998.
- 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, n.9, 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.
- PAPASAVVA-STYLIANOU, P.; KLEANTHOUS, M.; TOUMAZOS, P.; MAVRIKIOU, P.; LOUCAIDES, P. Novel polymorphisms at codons 146 e 151 in the prion protein gene of Cyprus goats and their association with natural scrapie. **The Veterinary Journal**. v.173, n.2, p.459-462, 2007.
- 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, N.C.; 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. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. **Journal of Comparative Pathology**. v. 71, p. 101-109, 1961.
- PRUSINER, S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**. v.216, p.136-144, 1982.
- PRUSINER, S.B. The prion diseases. **Scientific American**. v.272, n.1, p.48-57, 1995.
- 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.
- RODEN, J. A.; NIEUWHOF, G.J.; BISHOP, S.C.; JONES, D.A.; HARESIGN, W.; UBBINS, S. Breeding programmes for TSE resistance in British sheep. I. Assessing the impact on prion protein (PrP) genotype frequencies. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 73, n. 1, p. 1-16, 2006.
- 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.; 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, n.3, p. 211-217, 2004.
- SARGISON, N. Scrapie in sheep and goats. **In Practice**. v.17, p. 467-469, 1995.
- SCHMERR, M.J.; CUTLIP, R.C.; JENNY, A. Capillary isoelectric focusing of the scrapie prion protein. **Journal of Chromatography**. v.802, p.135-141, 1998.

- SCHNEIDER, K.; FANGERAU, H.; MICHAELSEN, B.; RAAB, W.H. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. **Brain Research Bulletin**. v.77, n.6, p.343-355, 2008.
- 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.; VAN KEULEN, L.J.M.; VROMANS, M.E.W.; LANGEVELD, J.P.M.; SMITS, M.A. Tonsillar biopsy and PRPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. **Veterinary Record**. v.142, p.564-568, 1998.
- 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.; KONOLD, T.; SIMMONS, H.A.; SPENCER, Y.I.; LOCKEY, R.; SPIROPOULOS, J.; EVERITT, S.; CLIFFORD, D. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. **BMC Veterinary Research**. v.3, p.20, 2007.
- SIMMONS, H.A.; SIMMONS, M.M.; SPENCER, Y.I.; CHAPLIN, M.J.; POVEY, G.; DAVIS, A.; ORTIZ-PELAEZ, A.; HUNTER, N.; MATTHEWS, D.; WRATHALL, A.E. Atypical scrapie in sheep from a UK research flock which is free from classical scrapie. **BMC Veterinary Research**. v.5, p.8, 2009.
- SMITS, M.A.; BOSSERS, A.; SCHREUDER, B.E.C. Prion protein and scrapie susceptibility. **Veterinary Quarterly**. v.19, p.101-105, 1997.
- SOTO, C. Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, p.809-819, 2004.
- SPIROPOULOS, J.; CASALONE, C.; CAMELLI, M.; SIMMONS, M.M. Immunohistochemistry for PrPSc in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v.33, p.398-409, 2007.
- 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 of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.14, p.3-7, 2002.
- THACKRAY, A.M.; KLEIN, M.A.; AGUZZI, A.; BUJDOSO, R. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. **Journal of Virology**. v.76, n.5, p.2510-2517, 2002.
- TOUZEAU, S.; CHASE-TOPPING, M.E.; MATTHEWS, L.; LAJOUS, D.; EYCHENNE, F.; HUNTER, N.; FOSTER, J.D.; SIMM, G.; ELSEN, J.M.; WOOLHOUSE, M.E. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. **Archives of Virology**. v.151, n.4, p.735-751, 2006.

- VACCARI, G.; CONTE, M.; MORELLI, L.; DI GUARDO, G.; PETRAROLI, R.; AGRIMI, U. Primer extension assay for prion protein genotype determination in sheep. **Molecular and Cellular Probes**. v.18, n.1, p.33-37, 2004.
- VACCARI, G.; DI BARI, M.A.; MORELLI, L.; NONNO, R.; CHIAPPINI, B.; ANTONUCCI, G.; MARCON, S.; ESPOSITO, E.; FAZZI, P.; PALAZZINI, N.; TROIANO, P.; PETRELLA, A.; DI GUARDO, G.; AGRIMI, U. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. **Journal of General Virology**. v.87, n.5, p.1395-1402, 2006.
- VAN KEULEN, L.J.M.; SCHREUDER, B.E.C.; MELOEN, R.H.; MOOIJ-HARKES, 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, n.5, p.1228-1231, 1996.
- 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.
- WEAR, A.; HENDERSON, K.; WEBSTER, K.; PATEL, I. A comparison of rapid bovine spongiform encephalopathy testing methods on autolyzed bovine brain tissue. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.17, p. 9-103, 2005.
- WEISSMANN, C.; ENARI, M.; KLÖHN, P.C.; ROSSI, D.; FLECHSIG, E. Molecular biology of prions. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**. v. 62, p.153-166, 2002.
- 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.; 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.
- 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.
- 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.
- WOOD, J.L.; DONE, S.H. Natural scrapie in goats: neuropathology. **Veterinary Record**. v.131, n.5, p.93-96, 1992.
- WOOD, J.L.; LUND, L.J.; DONE, S.H. The natural occurrence of scrapie in moufflon. **Veterinary Record**. v.130, n.2, p.25-27, 1992.

WOOLHOUSE, M.E.; STRINGER, S.M.; MATTHEWS, L.; HUNTER, N.;
ANDERSON, R.M. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock.
Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. v.265, n.1402, p.1205-
1210, 1998.