

Scrapie e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul¹

Héllen M. Martins², Nilton M. Carvalho², Nickolly L.K.S. Ribas², David Driemeier³, Ricardo A.A. Lemos⁴ e Eurípedes B. Guimarães^{4*}

ABSTRACT- Martins H.M., Carvalho N.M., Ribas N.L.K.S., Driemeier D., Lemos R.A.A. & Guimarães E.B. 2012. [**Scrapie and differential diagnosis in sheep in Mato Grosso do Sul, Brazil.**] *Scrapie e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira* 32(12):1230-1238. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil. E-mail: euripedes.guimaraes@ufms.br

Scrapie is a fatal neurodegenerative infectious disease, caused by the scrapie prion (PrP^{sc}), that can both in the as the classic form in genetically susceptible sheep and goats and in the atypical form in sheep. The first official notification of scrapie from Brazil was made to the World Organization for Animal Health (OIE) in 1985, in the state of Rio Grande do Sul, although the disease was first documented in this Brazilian state in 1978. The objective this paper was to describe two outbreaks of scrapie in sheep from Mato Grosso do Sul (MS), Brazil, and to investigate by immunohistochemistry (IHC) the presence of PrP^{sc} in samples from the CNS of sheep examined during 2003 and 2010. The study was conducted in two stages; the first was the observation of two sheep with typical clinical signs of scrapie that underwent clinical examination with emphasis on neurological parameters, epidemiological data collection, necropsy and collection of samples in duplicate forwarded to the diagnosis of rabies, and for the IHC diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies. In the second part of the study, a survey was made the necropsy reviewing gross findings and histopathological diagnoses in sheep from May 2003 to March 2010. Samples of the central nervous system of fifty-one cases, including the two sheep mentioned above were subjected to IHC for detection of prion protein. The other 49 sheep, although displaying neurological-disease which should be included as scrapie differential diagnosis, had their tissues submitted to IHC resulting negative.

INDEX TERMS: Diseases of sheep, scrapie, prion, central nervous system.

RESUMO.- *Scrapie* é uma doença infecciosa, neurodegenerativa fatal, causada pelo *príon scrapie* (PrP^{sc}). Apresenta-se tanto na forma clássica em ovinos e caprinos geneticamente susceptíveis quanto na forma atípica em ovinos. A primeira notificação oficial do Brasil à Organização Mundial de Saú-

de Animal (OIE), um caso da forma clássica diagnosticado no Rio Grande do Sul ocorreu em 1985, mas a doença já havia sido diagnosticada no mesmo Estado em 1978. Este trabalho objetivou descrever dois surtos de *Scrapie* em ovinos em Mato Grosso do Sul (MS), Brasil e investigar, por meio de imuno-histoquímica (IHQ) a presença de PrP^{sc} no Sistema Nervoso Central (SNC) de ovinos examinados entre 2003 e 2010. Na primeira parte observaram-se dois ovinos com sinais clínicos típicos de scrapie, detalhando-se os sinais neurológicos, dados epidemiológicos, histopatológicos e amostras teciduais em duplicata desses ovinos foram encaminhadas para realização de diagnóstico de Raiva e para diagnóstico IHQ para príon. Na segunda parte realizou-se levantamento de laudos de necropsia e diagnósticos histopatológicos de ovinos, no período de maio de 2003 a março de 2010. Amostras de sistema nervoso central de 51 casos

¹ Recebido em 12 de março de 2012.

Aceito para publicação em 3 de agosto de 2012.

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Famez), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Senador Filinto Müller 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil.

³ Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande, MS. *Autor para correspondência: euripedes.guimaraes@ufms.br

foram selecionados, incluindo os dois já com diagnóstico de *Scrapie* mencionados acima; os tecido de todos esses ovinos foram submetidos à IHQ para detecção de proteína priônica. Os 49 ovinos avaliados apresentaram resultado negativo na IHQ para príon.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de ovinos, scrapie, príon, sistema nervoso central.

INTRODUÇÃO

Scrapie é uma doença infecciosa, neurodegenerativa progressiva e fatal, causada por uma isoforma anormal do Prion celular (PrP^c), denominada *Prion Scrapie* (PrP^{sc}) (Prusiner 1998). A doença pode apresentar-se na forma clássica em ovinos e caprinos geneticamente susceptíveis (AVMA 2002, Goldmann & Baylis 2004, González et al. 2009, OIE 2009) e na forma atípica, diagnosticada na Noruega, por Benestad et al. (2003), denominada "Nor98", posteriormente observada em outras partes do mundo (Arsac et al. 2007, Cosseddu 2007, Jeffrey & González 2007, Seuberlich et al. 2007, Colussi et al. 2008, Fediaevsky et al. 2008, Loiacono et al. 2009, Martínez 2010). A susceptibilidade genética de ovinos à doença se deve ao pleomorfismo nos códons 136, 154 e 171, do gene PrP^c. No entanto, recentemente a forma clássica da doença foi relatada no Brasil, em ovinos que apresentavam o pleomorfismo predominante nos códons 136, 143 e 171 (Andrade et al. 2011).

No Brasil, especificamente no Rio Grande do Sul (RS), há diagnóstico de *scrapie* clássica desde 1978, (Fernandes et al. 1978), mas a primeira notificação oficial à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) foi de um surto, também no RS, ocorrido em 1985, (Pereira 1996). Posteriormente, entre 1995 e 2010, foram registrados surtos, no RS, Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP) (OIE 2011a).

O objetivo deste trabalho foi descrever dois surtos e proceder o diagnóstico diferencial de *scrapie* em ovinos em MS, Brasil, investigando retrospectivamente, através de IHQ a presença de PrP^{sc} em amostras de sistema nervoso central (SNC) de ovinos do Estado.

MATERIAL E MÉTODOS

Na primeira etapa foi realizada a descrição clínico-epidemiológica de dois surtos, com comprometimento de ovinos de ambos os sexos, com três anos de idade, apresentando distúrbios neurológicos e diagnóstico laboratorial positivo para *scrapie*. Estes ovinos designados Ovi1 e Ovi2 foram levados pelos proprietários ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LAP/Famez/UFMS) em junho de 2006 e março de 2008 respectivamente. O Ovi1 era uma fêmea Hampshire Down, procedente do município de Campo Grande, MS e o Ovi2, um macho Suffolk procedente do município de Coxim, MS.

Na Famez/UFMS, ambos os ovinos foram examinados com ênfase para parâmetros neurológicos que, junto com os dados epidemiológicos informados pelos proprietários, permitiram forte suspeita clínica de *scrapie*. O Ovi1 foi internado em isolamento evidenciando piora progressiva dos distúrbios neurológicos, até estado terminal, quando foi eutanasiado. O Ovi2 teve morte espontânea e ambos foram necropsiados, colhendo-se, em duplicata, materiais para exames laboratoriais. Nos dois casos, um

conjunto de amostras foi fixado em formol a 10% e o outro refrigerado e encaminhado imediatamente ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Animais e Análise de Alimentos (Laddan) da Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal (IAGRO), para exames de imunofluorescência direta (IFD) e inoculação intracerebral em camundongos (IIC) para Raiva.

As suspeitas foram notificadas aos serviços oficiais de Defesa Sanitária Animal de MS (IAGRO e Superintendência Federal de Agricultura no MS (SFA/MS), que interditaram as propriedades. Parte das amostras fixadas em formol a 10% foram enviadas ao LAP/Famez/UFMS para histopatologia e parte para o laboratório do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV/UFRGS), para diagnóstico imuno-histoquímico de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's).

No primeiro surto foi acionado o Grupo Especial de Atenção a Suspeita de Enfermidades Exóticas ou Emergenciais do Estado de MS (GEASE/MS) que constituiu uma comissão para colher informações sobre ascendentes e descendentes da ovelha afetada (Ovi1), rastrear a propriedade e decidir sobre a destinação dos ovinos considerados de risco para disseminação da *scrapie*, bem como eleger os exames laboratoriais de suporte a serem realizados. Os ovinos considerados de risco foram eutanasiados, colhidas amostras de tecido linfóide associado ao sistema digestório para serem submetidos ao exame de IHQ, utilizando-se o cromógeno DAB (diaminobenzidina) no SPV/UFRGS.

No segundo surto, imediatamente após a notificação, os técnicos da IAGRO, visitaram a propriedade e levantaram informações a respeito do ovino afetado (Ovi2), e das condições de criação do rebanho.

Na segunda etapa do trabalho, realizou-se uma busca da doença examinando-se amostras de sistema nervoso central (SNC) de ovinos com idade superior a 12 meses, atendidos no LAP/Famez/UFMS, em cuja história clínica havia registros de sinais clínicos neurológicos. Para isto procedeu-se um levantamento retrospectivo, pesquisando-se os arquivos do LAP/Famez/UFMS, examinando-se os laudos de necropsia e diagnósticos histopatológicos de ovinos ou materiais colhidos por médico veterinários de campo que deram entrada no laboratório, no período de maio de 2003 a março de 2010. Foram selecionados, incluindo os dois com diagnóstico prévio de *scrapie*, 51 casos de ovinos com mais de 12 meses de idade, com histórico de sinais clínicos neurológicos e com resultados laboratoriais negativos para raiva. De cada caso foi separado um bloco de parafina contendo amostra do SNC, ao nível do bulbo, do qual se obtiveram dois cortes histológicos com 4 µm de espessura. Um espécime foi corado com Hematoxilina & Eosina (H&E) e o outro fixado em lâminas especiais com carga elétrica e submetido à IHQ empregando-se Microprova por capilaridade, e utilizando-se cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol) para detecção de proteína priônica, conjugado com anticorpo monoclonal F99/97.6.1 (VMRD 2010). Os cortes histológicos dos casos selecionados, juntamente com um controle positivo e um negativo, fornecidos pelo Laboratório Nacional Agropecuário, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de Pernambuco (Lanagro/MAPA/PE), foram submetidos ao teste de imuno-histoquímica. O protocolo utilizado é preconizado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa (IN) Nº 18 de 27 de fevereiro de 2004 atualizada pela IN Nº 36 de 5 de outubro de 2007 (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2007). Os cortes histológicos corados com H&E e os submetidos à IHQ foram examinados em microscopia de luz.

RESULTADOS

Durante a anamnese, a proprietária do Ovi1 informou que o mesmo era mantido em uma propriedade de criação de

ovinos das raças Hampshire Down e Texel e que foi conduzido ao Hospital Veterinário (HV) da FAMEZ/UFMS porque manifestou perda de peso, prurido e perda de lã. Depois de examinado, o ovino foi internado em uma baia individual e isolada e passou a manifestar ataxia e hipermetria moderada. Durante as duas semanas seguintes ao internamento os sinais clínicos neurológicos agravaram-se com ampliação das áreas deslanadas principalmente nos flancos (Fig.1). Na avaliação diária, ao ser retirado da baia o ovino apresentava tremores, caía e, ao se levantar, os distúrbios locomotores eram exacerbados. Com a evolução progressiva do quadro clínico decidiu-se pela eutanásia, na terceira semana de internação, que foi realizada de acordo com normas previstas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV2002).

O proprietário informou que o Ovi2 era procedente do RS, foi adquirido em uma exposição agropecuária em Campo Grande e levado para uma propriedade do município de Coxim, MS. Depois do período de adaptação foi posto em reprodução, produzindo 36 descendentes de ambos os sexos. No ano seguinte à aquisição, apresentou perda da condição corporal, evoluindo para incoordenação motora. Depois de uma semana de iniciado os sinais clínicos o ovino foi levado ao HV/FAMEZ/UFMS e, durante o transporte, houve piora do quadro clínico. Ao ser examinado, o ovino apresentou estado geral deficiente, perda de lã e sinais de incoordenação (Fig.2), que se agravavam quando era estimulado. Quando em repouso permanecia em decúbito esternal manifestando interesse por alimento, mas não conseguia beber água. Morreu no segundo dia de internação.

O exame clínico de ambos os ovinos revelou que, além do prurido, dos distúrbios neurológicos e da perda de lã, ao se coçar manualmente o dorso dos animais eles respondiam com reflexo de "mordiscar".

À necropsia, o exame externo do cadáver de ambos os ovinos mostrou estado geral ruim e extensas áreas deslanadas. O Ovi1 apresentou também edema submandibular e alguns poucos exemplares de *Haemonchus* spp. no abomaso. Os demais órgãos examinados não revelaram alterações significativas. O Ovi2 não mostrou alterações macroscópicas.



Fig.1. *Scrapie*. Ovelha Hampshire Down com 3 anos de idade, manifestando dificuldade de levantar e perda de lã.

O teste de Imunofluorescência Direta (IFD) nas amostras refrigeradas do SNC de ambos os casos, conduzido pelo Laddan/IAGRO foi negativo para raiva e o material foi redirecionado para a IIC.

A histopatologia realizada pelo LAP/FAMEZ/UFMS revelou vacúolos redondos, bem delimitados e de dimensões variáveis no pericário (Fig.3 e 4a) e distribuídos pelo neu-



Fig.2. *Scrapie*. Ovino Suffolk, com 3 anos de idade, manifestando dificuldade de se levantar e perda de lã.

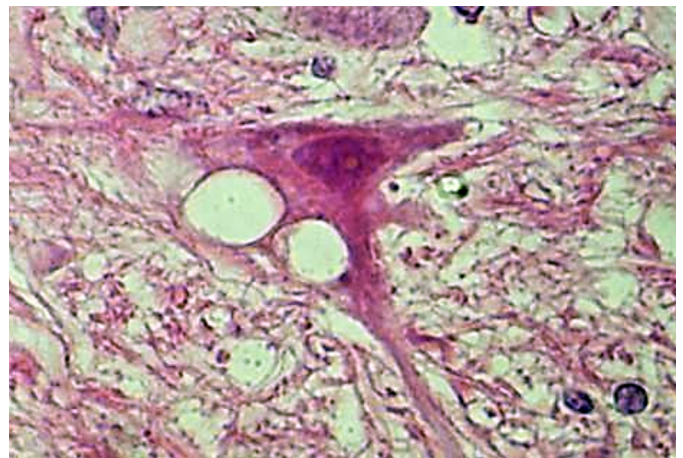


Fig.3. *Scrapie*. Neurônio apresentando dois vacúolos. HE, obj.100x.

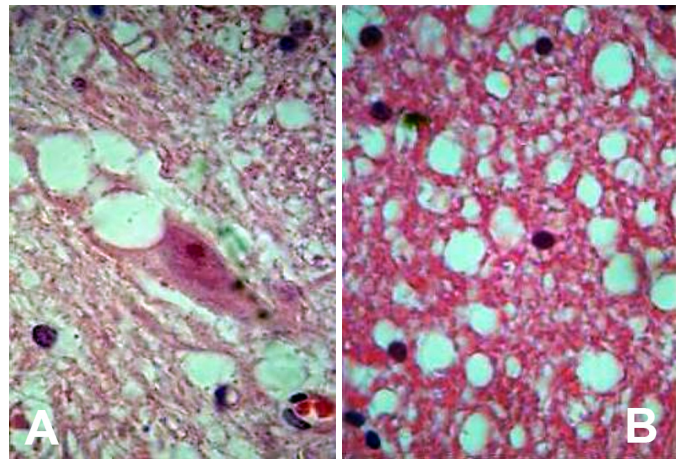


Fig.4a. *Scrapie*. Vacuolização no pericário neuronal. HE, obj.100x.

Fig.4b. *Scrapie*. Vacuolização no neurópilo. HE, obj.100x.

rópilo (Fig 4b). Estas lesões histológicas características de *scrapie*, apesar de mais evidentes no tronco encefálico em nível do óbex, ocorreram também no mesencéfalo, ponte, medula oblonga, cornos laterais e ventrais da medula espinhal. A imuno-histoquímica das amostras enviadas ao SPV/UFRGS confirmou a presença de Prion *scrapie* (PrP^{sc}) em ambos os casos.

A comissão constituída pelo GEASE/MS, acionada durante o primeiro surto, em 2006, colheu informações sobre ascendentes e descendentes do Ovi1, que pudessem oferecer risco de infecção ao rebanho. Constatou-se que a mesma era filha de uma fêmea adquirida em uma propriedade do Estado de São Paulo, não possuía irmãos e havia parido apenas uma vez, produzindo um macho já enviado ao abatedouro. Obteve-se informação de que a avó da ovelha em questão conviveu com ovinos importados do Canadá, mas a mesma não foi localizada.

Ao se rastrear a propriedade, identificaram-se 17 ovinos que estiveram nas baias maternidades, cinco dias antes e/ou após a data do nascimento e do parto da fêmea doente. Todos estes ovinos, considerados como de risco de disseminação da doença, foram eutanasiados de acordo o preconizado pelo CFMV, colhendo-se amostras do tecido linfóide associado ao tubo digestivo (GALT), com ênfase para as amígdalas e Placas de Peyer no terço final do íleo fixadas em solução de formol a 10% neutro e tamponado. Os cadáveres foram destruídos por incineração e as amostras, enviadas ao SPV/UFRGS para exame imuno-histoquímico. Destas, seis amostras (35,3%) das tonsilas, colhidas dos 17 ovinos eutanasiados apresentaram marcação granular positiva para PrP^{sc} em células foliculares (Fig.5).

De posse desses resultados e considerando a elevada susceptibilidade da raça Hampshire Down à *scrapie*, o GEASE decidiu pela eutanasia dos 89 ovinos dessa raça, restantes na propriedade. Não foram realizados exames laboratoriais nos materiais destes animais. Por recomendação do GEASE, as autoridades sanitárias não impuseram restrição à movimentação dos machos da raça Texel produzidos na propriedade.

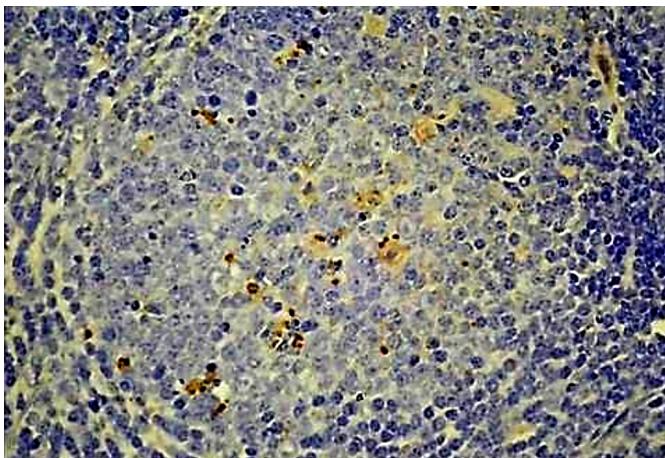


Fig.5. Marcação positiva de PrP^{sc} no centro do tecido linfóide de tonsila de ovinos que conviviam com ovelha positiva para *Scrapie*. Imuno-histoquímica (IHQ) pelo método streptavidina-biotina-peroxidase, obj.100x.

No segundo surto, os técnicos da IAGRO, visitaram a propriedade, levantaram informações a respeito do Ovi2 e das condições de criação do rebanho e preencheram o Formulário de Investigação de Doenças - Inicial (FORM-IN). Constataram que a doença observada somente no reprodutor, procedente do RS e adquirido na Exposição de Campo Grande/MS no ano de 2006. O animal havia produzido 36 descendentes, sendo 20 machos e 16 fêmeas. A propriedade foi interditada por um breve período de 45 dias.

Na segunda parte do estudo, o resultado da IHQ para pesquisa de prion no SNC dos 51 casos selecionados está expresso no Quadro I. Houve forte marcação de grumos marrom brilhantes no neurópilo e no pericário dos neurônios no bulbo na altura do óbex (Fig.6 e 7) somente nos dois casos de *scrapie* já diagnosticados.

De acordo com informações enviadas pelos médicos veterinários de campo ou colhidas no HV/Famez/UFMS, registradas nos laudos arquivados no LAP/Famez/UFMS, excluindo-se os dois casos positivos para *scrapie*, foram registrados nos demais, em ordem decrescente de ocorrência,

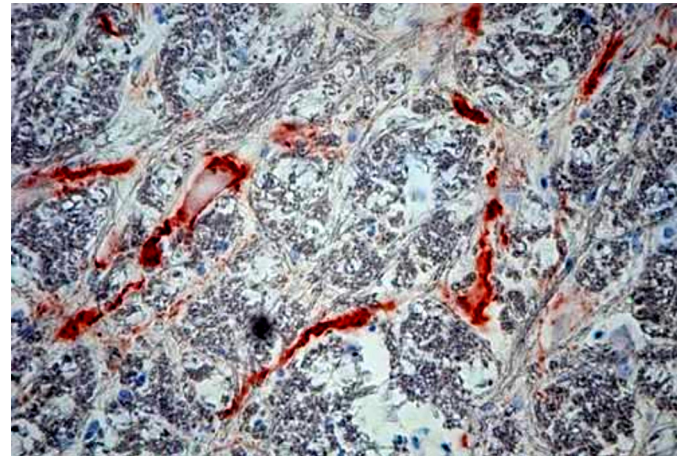


Fig.6. Marcação positiva de PrP^{sc} no bulbo na altura do óbex da ovelha com *Scrapie*. Imuno-histoquímica (IHQ) pelo método streptavidina-biotina-peroxidase + cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol), obj.100x.

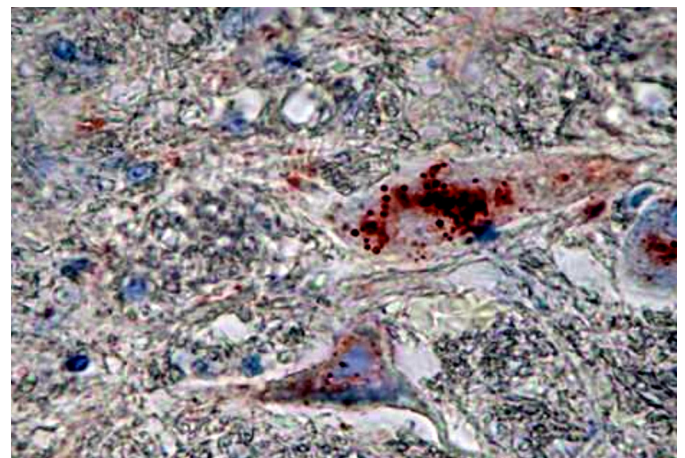


Fig.7. Marcação positiva de PrP^{sc} no bulbo na altura do óbex do ovino com *Scrapie*. Imuno-histoquímica (IHQ) pelo método streptavidina-biotina-peroxidase + cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol), obj.100x.

Quadro I. Imuno-histoquímica para PrP^{sc} no SNC de 51 ovinos de oito municípios de Mato Grosso do Sul, de ambos os sexos, com mais de 12 meses de idade, mortos apresentando sinais neurológicos, atendidos no LAP/FAMEZ/UFMS, no período de maio de 2003 a março de 2010

Nº	Sexo/ Idade	Sinais clínicos	Diagnóstico LAP/FAMEZ	%
01 ^a	F/72	Apatia, emagrecimento, decúbito, opistótono, pedalagem	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
02 ^a	F/12	Incoordenação motora	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
03 ^a	F/24	Incoordenação motora	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
04 ^a	F/48	Apatia	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
05 ^f	F/18	Apatia, decúbito, perda de lã	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
06 ^a	M/24	Apatia	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	21,6
07 ^a	F/72	Apatia, opistótono, pedalagem, rigidez de membros	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
08 ^a	M/18	Anorexia, emagrecimento, decúbito	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
09 ^b	F/24	Incoordenação motora	Endoparasitose/ <i>Haemonchus</i> sp.	
10 ^g	F/72	Incoordenação motora, tremores, opistótono, pedalagem	Endoparasitose/ <i>Oesophagostomus</i> sp.	
11 ^a	F/36	Decúbito, nistagmo	Endoparasitose/ <i>Strongylus/Eimeria</i> sp.	
12 ^d	F/48	Prurido, perda de lã, hipereciticabilidade	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
13 ^a	F/12	Apatia, incoordenação motora, decúbito esternal	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
14 ^a	F/72	Excitabilidade, prurido, perda de lã	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
15 ^a	F/24	Prurido, perda de lã, apatia, decúbito	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	13,7
16 ^a	F/24	Prurido, perda de lã, decúbito	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
17 ^a	F/12	Perda de lã, prurido.	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
18 ^a	F/96	Apatia, icterícia.	Intoxicação por <i>Brachiaria</i> sp.	
19 ^a	F/72	Apatia, incoordenação motora, atonia rumenal,	Intoxicação por cobre	
20 ^a	F/48	Apatia, anorexia, hematúria, icterícia, decúbito	Intoxicação por cobre	
21 ^a	F/20	Anorexia, icterícia, decúbito, salivação excessiva	Intoxicação por cobre	9,8
22 ^a	M/12	Apatia, anorexia, decúbito.	Intoxicação por cobre	
23 ^a	M/12	Incoordenação motora, apatia	Intoxicação por cobre	
24 ^a	F/14	Dificuldade de locomoção, opistótono	Indeterminado	
25 ^a	F/18	Incoordenação motora, tremores e opistótono	Indeterminado	
26 ^a	F/18	Perda de lã	Indeterminado	7,8
27 ^a	F/18	Apatia, andar em círculo, cegueira	Indeterminado	
28 ^a	M/12	Apatia, anorexia, decúbito, opistótono	Pneumonia	5,9
29 ^a	M/24	Dificuldade de locomoção, decúbito lateral, pedalagem	Pneumonia	
30 ^a	F/48	Apatia, depressão, decúbito	Pneumonia	
31 ^a	F/12	Incoordenação motora, decúbito, opistótono	Edema pulmonar agudo	3,9
32 ^a	M/18	Incoordenação motora, opistótono,	Edema pulmonar agudo	
33 ^a	F/72	Apatia, incoordenação motora, convulsão, opistótono	Cetose	3,9
34 ^a	F/24	Apatia, tremores musculares, opistótono	Cetose	
35 ^a	F/18	Apatia, anorexia, decúbito, ranger de dentes, decúbito	Cirrose hepática	3,9
36 ^a	M/36	Incoordenação motora, cegueira, tremores, decúbito	Cirrose hepática	
37 ^a	M/18	Apatia, anorexia, emagrecimento	Intoxicação por <i>Enterolobium</i> sp	3,9
38 ^a	F/24	Apatia, anorexia, emagrecimento	Intoxicação por <i>Enterolobium</i> sp	
39 ^{*a}	F/36	Prurido, perda de lã, ataxia, incoordenação motora	Scrapie	3,9
40 ^{*e}	M/36	Prurido, perda de lã, ataxia, incoordenação motora	Scrapie	
41 ^a	F/36	Decúbito, pedalagem	Enterotoxemia	3,9
42 ^a	F/24	Convulsão, opistótono, nistagmo, pedalagem	Enterotoxemia (Compatível)	
43 ^a	F/24	Incoordenação motora	Micotoxicose (Sugestivo)	3,9
44 ^a	M/24	Incoordenação motora, tremores, opistótono	Micotoxicose (Sugestivo)	
45 ^a	F/24	Andar cambaleante, opistótono, pedalagem	Meningite supurativa difusa	1,9
46 ^c	F/18	Incoordenação motora, cegueira, andar em círculo,	Encefalite purulenta	1,9
47 ^a	M/18	Incoordenação motora cegueira, decúbito, pedalagem	Polioencefalomalacia	1,9
48 ^b	NI/18	Prurido, opacidade de córnea, cegueira	Ectima Contagioso	1,9
49 ^a	M/12	Encontrado morto	Intoxicação química (organofosforado)	1,9
50 ^a	M/48	Incoordenação motora	Prolapso retal	1,9
51 ^a	F/24	Incoordenação motora	Rumenite necrosante multifocal	1,9

^aCampo Grande = 44; ^bJaraguari = 1; ^cSanta Rita do Rio Pardo = 1; ^dRochedinho = 1; ^eCoxim = 1; ^fFátima do sul = 1; ^gJardim = 1; ^hChapadão do Sul. *Positivos para scrapie na IHQ.

em 49 ovinos diferentes, os seguintes sinais clínicos neurológicos passíveis de diagnóstico diferencial para a doença: apatia (19/38,8%), incoordenação motora (17/39,7%), decúbito (16/32,6%), prurido e perda de lã (9/18,4%), movimento de pedalagem (7/14,3%), anorexia (2/4,2%), opistótono (2/4,2%), sialorréia, cegueira, convulsão, nistagmo, alteração comportamental e emagrecimento e outros distúrbio neurológicos (1/2,1%). A histopatologia, associada às informações clínicas e epidemiológicas desses

casos possibilitou a formulação de diferentes diagnósticos, expressos no Quadro I.

DISCUSSÃO

Ambos os casos de scrapie foram notificados às autoridades sanitárias oficiais porque, de acordo com a legislação vigente, esta enfermidade faz parte da lista de doenças de notificação compulsória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

Clinicamente, as manifestações de prurido e perda de lã, evoluindo para distúrbios locomotores decúbito e morte, apresentadas pelos dois ovinos enviados à Famez/UFMS e positivos para *scrapie*, são também descritas nos manuais oficiais de controle da doença (AQIS 2000, ANSC 2002, CFIA 2004, OIE 2009) e, segundo Van Keulen et al. (2002) e Driemeier (2007) são características da doença. O reflexo de “mordiscar” expresso ao se manipular a região dorsal de ambos os animais, considerado patognomônico nos casos de *scrapie*, é também citado por Driemeier (2007), descrito no Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (OIE 2009).

À necropsia a avaliação dos cadáveres revelou somente estado geral ruim e múltiplas áreas deslanadas. Estes achados, apesar de inespecíficos são, de acordo com Driemeier (2007) e Maxie & Youssef (2007) frequentes nos casos de *scrapie*.

O diagnóstico *post mortem* definitivo de *scrapie* nos dois ovinos foi feito pela histopatologia e IHQ conforme prevêem o MAPA e a OIE (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2008, OIE 2009).

O quadro histopatológico observado nos cortes do SNC de ambos os ovinos revelou grandes vacúolos no pericário neuronal (Fig.2 e 5a) e, segundo Barros et al. (2001), Barros et al. (2006) e Sofiandis et al. (2006), ocorrem em casos de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's), doenças priônicas entre as quais inclui *scrapie* dos ovinos e caprinos. Segundo Prusiner (1997), estes vacúolos correspondem ao acúmulo de PrP^{sc} não degradado por proteases endógenas, cuja presença foi confirmada pela IHQ para príon. A vacuolização do neurópilo, mais intensa no Ovi2, conferindo um aspecto de esponja (Fig.5b) de acordo Barros et al. (2006) resulta do acúmulo de PrP^{sc} nos neuritos, isto é, nos prolongamentos neuronais, constante em casos de EET's. Em ambos os animais, estas lesões, apesar de mais evidentes no tronco encefálico ao nível do óxex, foram observadas também no mesencéfalo, ponte, medula oblonga, cornos laterais e ventrais da medula espinhal, concordando com as descrições de Summers et al. (1995), Driemeier (2007), Maxie & Youssef (2007) e McGavin & Zachary (2009), para os casos de *scrapie*.

O diagnóstico prévio de *scrapie* nos dois ovinos foi confirmado pela IHQ para doenças priônicas, um teste altamente específico e sensível que, segundo Dennis et al. (2009) é capaz de detectar baixas concentrações de PrP^{sc}, não só do SNC, como também em diversos tecidos linfóides de ovinos e caprinos afetados de *scrapie*. Conforme afirma Hoinville (1996), este teste é de grande utilidade para o diagnóstico da doença em animais recém-infectados, em fase de incubação ou com sinais iniciais da doença, quando as alterações histopatológicas ainda podem estar ausentes ou serem incipientes, com possibilidade de diagnóstico falso negativo na histopatologia. Neste caso, segundo Haritani et al. (1994) e Webb (2009), a IHQ, no tecido linfóide junto com SNC, torna-se uma importante ferramenta na elucidação do diagnóstico de *scrapie*.

Com relação ao primeiro surto, o rastreamento e colheita de informações sobre partos e ascendentes do animal, realizada pela Comissão do GEASE/MS atendeu as exigên-

cias do Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (OIE, 2009), o qual afirma que as ovelhas com *scrapie* podem eliminar o agente e infectar a prole por via oral, desde o parto até o desmame, o que é corroborado por Hamir et al. (2009). As crias infectadas tornam-se importantes fontes de contaminação para restante do rebanho. A conclusão do GEASE/MS de que, a partir desse foco, não ocorreu disseminação da doença porque a propriedade não comercializava fêmeas e que somente estas transmitiriam a *scrapie* via placenta e secreções placentárias, conforme afirmam Andréoletti et al. (2002), O'Rourke et al. (2002) e Tuo et al. (2002) deve, atualmente, ser vista com restrição, uma vez que a literatura recente informa que o ovino infectado com PrP^{sc} pode excretar o agente também através da pele (Thomzig et al. 2007), leite (Konold et al. 2008, Lacroux et al. 2008, Maddison et al. 2009, Ligios et al. 2011), fezes (Tamgüney 2009; Terry et al. 2011), urina (Murayama et al. 2007, Gregori et al. 2008, Rubenstein et al. 2011), saliva (Vascellari et al. 2007, Maddison 2010), sangue (Murayama et al. 2007, Terry et al. 2009, Edwards et al. 2010) e secreções nasais (Bessen et al. 2010). A placenta, segundo Gough & Maddison (2010) é via por onde o PrP^{sc} é mais intensamente eliminado, mas as demais fontes não devem ser negligenciadas, ao se estabelecer medidas de controle sanitário da doença.

A eutanásia e destruição dos 89 ovinos que entraram em contato com a ovelha durante o seu parto, considerados de alto risco por terem sido infectados com o príon recém-eliminado via placenta, até então preconizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2008) não é suficiente para oferecer segurança na prevenção da disseminação do príon, uma vez que, dependendo do tipo de solo, o PrP^{sc} pode ser retido por até três anos, conforme afirmam Gough & Maddison (2010), Maddison et al. (2010) e Nagaoka et al. (2010) ou, segundo Georgsson et al. (2006), por até 16 anos em instalações abandonadas.

O elevado índice de positividade à IHQ do tecido linfóide das tonsilas palatinas, em seis (35,3%) dos 17 ovinos de alto risco, mas ainda sem sinais clínicos, mostra a dimensão do problema relacionado com a disseminação da *scrapie* em uma propriedade infectada. Além disso, questiona-se se entre os ovinos avaliados não teriam mais portadores assintomáticos uma vez que, de acordo com Monleón et al. (2011), a sensibilidade do tecido linfóide resultante de biópsias da mucosa retal e da terceira pálpebra é, no máximo, de 48% e 44% respectivamente. Isto porque, segundo Van Keulen et al. (1996) e Dennis et al. (2009), um número relativamente alto de animais infectados apresenta um mínimo ou não apresenta envolvimento do tecido durante a patogênese de *scrapie*.

No segundo surto, com base na literatura recente, o comprometimento de somente um macho não é suficiente para se concluir pela impossibilidade de disseminação da doença, uma vez que autores como Murayama et al. (2007), Thomzig et al. (2007), Vascellari et al. (2007), Gregori et al. (2008), Tamgüney (2009), Bessen et al. (2010), Maddison (2010), Rubenstein et al. (2011) e Terry et al. (2011), afirmam que o ovino infectado com PrP^{sc} de *scrapie* clássica pode excretar o agente por diversas vias tais como pele,

fezes, urina, saliva e secreções nasais. Neste caso, infere-se que o macho infectado também adquira importância na disseminação do PrP^{sc} e no controle da doença em um plantel.

Com relação à segunda parte do estudo, os resultados expressos no Quadro I, demonstram que as endoparasitoses aparecem em primeiro lugar com (11/21,6%) dos 49 diagnósticos, excluindo-se os dois casos de *scrapie*. Segundo Driemeier (2007), os ovinos gravemente afetados de endoparasitos manifestam sinais de apatia, anorexia e emagrecimento, compatíveis com a forma inicial da *scrapie*, descrita nos manuais oficiais (AQIS 2000, APHIS 2009, NZFSA 2009, OIE 2009). A maioria das endoparasitoses tratava-se de hemonose, condição que, segundo Rissi et al. (2010), cursa com quadro clínico predominantemente crônico, com perda da condição geral e emagrecimento progressivo, importante no diagnóstico diferencial de *scrapie*.

Na sequência aparece a intoxicação por *Brachiaria* sp. em (7/13,7%). O diagnóstico baseou-se, principalmente, na observação de alterações hepáticas relacionadas à ingestão de *Brachiaria* sp., descritas por Lemos et al (1998). Os ovinos doentes apresentaram alteração comportamental, incoordenação, decúbito, movimentos de pedalagem, opistótono, sialorréia e distúrbios do sistema digestório. Estes sinais são compatíveis com os decorrentes de distúrbios metabólicos ou tóxicos com comprometimento hepático e desenvolvimento de síndrome sugestiva de encefalopatias hepáticas conforme descrevem Driemeier (2007), Maxie & Youssef (2007) e McGavin & Zachary (2009). No que diz respeito ao sinal de prurido e perda de lã, citado na maioria dos casos de intoxicação por *Brachiaria*, além de ser característica de *scrapie*, esta alteração é referenciada na literatura por Driemeier (2007), Saturnino et al. (2010) e Albarnaz et al. (2010), como presente nos casos de fotossensibilização decorrente da intoxicação com comprometimento hepático por saponinas presentes nas pastagens de *Brachiaria* sp.

Ainda dentre as hepatopatias ocorreram dois diagnósticos de cetose (2/3,9%) e dois de cirrose (2/3,9%). Os ovinos com cetose manifestaram apatia, incoordenação motora, convulsão, tremores musculares e opistótono que, de acordo com Schild (2007), são frequentes nos casos da doença em ovinos. Já os com cirrose manifestaram apatia, anorexia, cegueira, tremores, decúbito e opistótono, compatíveis com os sinais clínicos descritos por Maxie & Youssef (2007) para casos de insuficiência hepática, cuja etiologia pode, segundo estes autores ser também devido a intoxicação por *Brachiaria* sp elevando para (9/17,6%) a frequência de patologias de ovinos decorrentes da ingestão prolongada da planta.

Foi diagnosticada a intoxicação por cobre em (5/9,8%) ovinos que manifestaram sinais caracterizados por depressão, fraqueza, hematuria, icterícia, decúbito, estase ruminal e salivagem, compatíveis com as citações de Oruc et al. (2009) que segundo o Manual da OIE (2009), são possíveis de ocorrerem nos casos de *scrapie* e devem ser levados em conta no diagnóstico diferencial.

Houve também o diagnóstico de (2/3,9%) casos de enterotoxemia, (1/1,9%) de polioencefalomalacia, (1/1,9%) de meningite supurativa difusa e (1/1,9%) de encefalite

purulenta. Estas patologias em ovinos, de acordo com Driemeier (2007) e Maxie & Youssef (2007), McGavin & Zachary (2009), Pimentel et al. (2010) podem cursar com sinais neurológicos caracterizados por depressão severa, tremores musculares, ataxia, movimentos de pedalagem, opistótono, nistagmo, decúbito, paralisia, coma e morte, devendo ser diferenciados de *scrapie*.

No presente estudo a IHQ para Prion não revelou *scrapie* em ovinos autóctones de MS. Nos dois casos registrados, um era descendente de animais importados (Surto 1) e o outro proveniente de outro Estado (Surto 2). Neste caso é provável que a fêmea positiva tenha sido infectada pela mãe antes de ser trazida para o MS e o macho foi infectado no Estado de origem. Estes resultados ressaltam a importância da adoção, pelas autoridades responsáveis pela vigilância oficial de enfermidades de animais de interesse econômico no MS, de programas de vigilância epidemiológica de *scrapie*. Medidas dessa natureza poderiam controlar a disseminação da doença, principalmente através de diagnóstico precoce da infecção em criatórios de ovinos. A adoção de programas rigorosos de controle é fundamental, principalmente considerando-se que a contaminação ambiental pelo animal infectado, doente ou não, pode-se dar por várias vias como fazem referência Andréoletti et al. (2002), Thomzig et al. (2007), Bessen et al. (2010), Edwards et al. (2010), Maddison (2010), Ligios et al. (2011), Rubenstein et al. (2011) e Terry et al. (2011). A descontaminação natural de instalações e do solo pode ser demorada conforme afirmam Georgsson et al. (2006) e Nagaoka et al. (2010).

REFERÊNCIAS

- Albarnaz T.T., Silveira J.A.S., Silva N.S., Oliveira C.H.S., Reis A.S.B., Oliveira C.M.C., Duarte M.D. & Barbosa J.D. 2010. Fotossensibilização em ovinos associada à ingestão de *Brachiaria brizantha* no Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 30(9):741-748.
- Andrade C.P., 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 prions Suffolk sheep in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 31(10):893-898
- Andréoletti O., Lacroux C., Chabert A., Monnereau L., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Benestad S.L., Elsen J.M. & Schelcher F. 2002. PrP^{sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* 83:2607-2616.
- ANSC 2002. Department of Animal Sciences, Purdue University. Scrapie. Disponível em <<http://www.ag.ansc.purdue.edu/.../2002/Scrapie/Scrapie.htm>> Acesso em 9 set. 2010.
- APHIS 2009. The Animal and Plant Health Inspection Service of United States Department of Agriculture. Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE). Disponível em <http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahtse.html> Acesso em 16 mai. 2010.
- AQIS 2000. Australian Quarantine and Inspection Service. Import risk analysis through the revision of import policy related to scrapie. Disponível em <http://www.daff.gov.au/_data/assets/word_doc/0019/16543/00-038a.doc> - 155k> Acesso em 12 jun. 2010
- Arsac J.N., Andréoletti O., Bilheude J.M., Lacroux C., Benestad S.L. & Baron T. 2007. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg. Infect. Dis.* 13(1):58-65.
- AVMA 2002. National Veterinary Accreditation Program. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* Disponível em <<http://avmajournals.avma.org/loi/javma>> Acesso em 2 jul. 2010.

- OIE 2011a. World Animal Health Information Database (WAHID) Interface. World Organisation For Animal Health <<http://web.oie.int/wahis/public.php?page=home>> Acessado em 13 dez.2011.
- OIE 2011b. OIE Listed diseases 2011. World Organization for Animal Health. <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2011/>> Acessado em 20 ago. 2011.
- Oruc H.H., Cengiz M. & Beskaya A. 2009. Chronic copper toxicosis in sheep following the use of copper sulfate as a fungicide on fruit trees. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:540-543
- 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.* 9:966-971.
- Pereira E.A.M. 1996. Encefalopatia Espongiforme Bovina. Anais Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande, MS.
- Pimentel L.A., Oliveira D.M., Galiza G.J.N., Dantas A.F.M., Uzal F. & Riet-Correa F. 2010. Encefalomalacia focal simétrica em ovino. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):423-427.
- Prusiner S.B. 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 275(5336):245-251.
- Prusiner S.B. 1998. Prions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95:13363-13383.
- Rissi D.R., Pierezan F., Oliveira Filho J.C., Figuera R.A., Irigoyen L.F., Kommers D. & Barros C.S.L. 2010. Doenças de ovinos da região Central do Rio Grande do Sul: 361 casos. *Pesq. Vet. Bras.* 30(1):21-28.
- Rubenstein R., Chang B., Gray P., Piltch M., Bulgin M.S., Sorensen-Melson S. & Miller M.W. 2011. Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease. *J. Virology* 85(17):9031-9038.
- Saturnino K.C., Mariani T.M., Ferreira M.B., Brum K.B., Fernandes C.E.S. & Lemos R.A.A. 2010. Intoxicação experimental por *Brachiaria decumbens* em ovinos confinados. *Pesq. Vet. Bras.* 30(3):195-202.
- Schild A.L. 2007. Cetose, p.281-293. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. Editora-Pallotti, Santa Maria, RS.
- Seuberlich T., Botteron C., Benestad S.L., Brünisholz H., Wyss R., Kihm U., Schwerner H., Fiess M., Nicolier A., Heim D. & Zurbriggen A. 2007. Atypical in a swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1):2-8.
- Sofiandis G., Psychas V., Billinis C., Spyrou V., Argyroudis S., Papaioannou N. & Vlemmas I. 2006. Histopathological and immune-histochemical features of natural goat scrapie. *J. Comp. Pathol.* 135(2/3):116-129.
- Summers B.A., Cummings J.F. & Lahunta A. 1995. *Veterinary Neuropathology*. Mosby-Year Book, St Louis, p.136-139.
- Tamgüney G., Miller M.W., Wolfe L.L., Sirochman T.M., Glidden D.V., Palmer C., Lemus A., DeArmond S.J. & Prusiner S.B. 2009. Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature* 461:529-532.
- Terry L.A., Howells L., Hawthorn J., Bishop K., Baker C.A., Everest S., Thorn L., Maddison B. & Gough C. 2011. Detection of Prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *J. Virol.* 83(23):12552-12558.
- Terry L.A., Howells L., Hawthorn J., Edwards J.C., Moore S.J., Bellworthy S.J., Simmons H., Lizano S., Estey L., Leathers V. & Everest S.J. 2009. Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J. Virol.* 83(23):12552-12558.
- Thomzig A., Schulz-Schaeffer W., Wrede A., Wemheuer W., Brenig B., Kratzel C., Lemmer K. & Beekes M. 2007. Accumulation of pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *Plos. Pathog.* 3(5):e66.
- Tuo W., O'Rourke K.I., Zhuang D., Cheevers W.P., Spraker T.R. & Knowles D. P. 2002. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie infected sheep. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(9):6310-6315.
- Van Keulen L.J., Schreuder B.E., Meloen R.H., Mooij-Harkes G., Vromans M.E. & Langeveld J.P. 1996. Immuno-histochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.* 34(5):1228-1231.
- Van Keulen L.J., Vromans E.W. & Van Zijderveld F.G. 2002. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 110:23-32.
- Vascellari M., Nonno R., Mutinelli F., Bigolaro M., Di Bari M.A., Melchioni E., Marcon S., D'Agostino C., Vaccari G., Conte M., De Grossi L., Rosone F., Giordani F. & Agrimi U. 2007. PrP^{Sc} in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J. Gen. Virol.* 88:2890-2898.
- VMRD 2011. *Veterinary Diagnostics Monoclonal Antibodies. Bovine Spongiform Encephalopathy Antigen Test Kit Immuno-histochemistry*. Disponível em <<http://www.vmr.com/products/testkits/detail.asp?CATNO=298>> Acesso em 5 mar. 2010
- Webb P.R., Powell L., Denyer M., Marsh S., Weaver C., Simmons M.M., Johns E., Sheehan J., Horsfield P., Lyth C., Wilson C., Long A., Cawthraw S., Saunders G.C. & Spencer Y.I.A. 2009. Retrospective immunohistochemical study reveals atypical scrapie has existed in the United Kingdom since at least 1987. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21(6):826-829.