

CRISTINA BALLISTA ARRUA

PARAPLEXIA ENZOÓTICA DOS OVINOS (SCRAPIE)
ESTUDO HISTOQUÍMICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista, no Curso de Especialização em Gestão em Defesa Agropecuária – Ênfase em Sanidade Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. MSc Renato Silva de Sousa

CURITIBA

2011

TERMO DE APROVAÇÃO

CRISTINA BALLISTA ARRUA

PARAPLEXIA ENZOÓTICA DOS OVINOS (SCRAPIE)
ESTUDO HISTOQUÍMICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista no Curso de Especialização em Gestão em Defesa Agropecuária – Ênfase em Sanidade Animal da Universidade Federal do Paraná pela seguinte banca examinadora:



Prof. Renato Silva de Sousa
Departamento de Medicina Veterinária



Prof. Antônio Waldir Cunha da Silva
Departamento de Medicina Veterinária



Prof. José Francisco Ghignatti Warth
Departamento de Medicina Veterinária

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Renato Silva de Sousa, meu orientador, por toda sua amizade e dedicação, e preciosa colaboração, disponibilizadas durante a realização deste intento.

Aos meus familiares, Gregório e Luciano, pela paciência, compreensão, carinho e incentivo, em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis, na concretização desta empreitada.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Myriam, pela perseverança e determinação para transpor os obstáculos surgidos ao longo da existência, a mim ensinadas desde a infância.

À colega Maria Angela Teixeira, pelo incentivo, pela valorosa colaboração prestada e pela amizade demonstrada.

Ao colega Silmar Pires Bürer, pelo empenho junto ao Governo do Estado do Paraná, para a concretização do projeto idealizado deste curso de especialização.

Ao Governo do Estado do Paraná, pela concessão de recursos para a viabilização do Curso de Especialização em Gestão em Defesa Agropecuária.

À Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná e ao “Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti”, nas pessoas daqueles que permitiram e colaboraram para minha participação neste curso e para a concretização deste projeto.

Aos mestres, pela dedicação com que ministraram as disciplinas do Curso de Especialização em Gestão em Defesa Agropecuária – Defesa Sanitária Animal.

A todos que, de forma indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS VACÚOLOS CONFORME DIMENSÃO E DELIMITAÇÃO.....	37
TABELA 2 – COMPARAÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA COM A PRESENÇA DE VACÚOLOS NEURONAIS.....	38
TABELA 3 – DETECÇÃO DE VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA IHQ.....	38
TABELA 4 – CLASSIFICAÇÃO DOS VACÚOLOS CONFORME DIMENSÃO E DELIMITAÇÃO, NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA IHQ.....	40
TABELA 5 – CLASSIFICAÇÃO DOS VACÚOLOS CONFORME DIMENSÃO E DELIMITAÇÃO, NAS AMOSTRAS NEGATIVAS PARA IHQ, TESTADAS NOS DOIS CORTES EXAMINADOS.....	42
TABELA 6 – DETECÇÃO DE VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, NAS AMOSTRAS NEGATIVAS PARA IHQ, TESTADAS EM APENAS UM DOS CORTES.....	42
TABELA 7 – CLASSIFICAÇÃO DOS VACÚOLOS CONFORME DIMENSÃO E DELIMITAÇÃO, NAS AMOSTRAS NEGATIVAS PARA IHQ, TESTADAS EM APENAS UM DOS CORTES.....	44
TABELA 8 – CLASSIFICAÇÃO DOS VACÚOLOS CONFORME DIMENSÃO E DELIMITAÇÃO, PARA AS AMOSTRAS NÃO TESTADAS POR IHQ..	45

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CARACTERÍSTICAS DA FORMA NORMAL E ANORMAL DA PROTEÍNA PRIÔNICA (PRP).....	16
QUADRO 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA.....	36
QUADRO 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA IHQ.....	39
QUADRO 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, NAS AMOSTRAS NEGATIVAS PARA IHQ NOS DOIS CORTES EXAMINADOS.....	41
QUADRO 5 – DISTRIBUIÇÃO DOS VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, NAS AMOSTRAS NEGATIVAS PARA IHQ, TESTADAS EM APENAS UM DOS CORTES.....	43
QUADRO 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS VACÚOLOS NOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ROTINA, PARA AS AMOSTRAS NÃO TESTADAS POR IHQ.....	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS ISOFORMAS DA PROTEÍNA PRIÔNICA.....	15
FIGURA 2 – OVINO, SCRAPIE, NEURÔNIO COM MÚLTIPLOS VACÚOLOS NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	31
FIGURA 3 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLOS GRANDES E DUPLOS NO PERICÁRIO NEURONAL CONTENDO MATERIAL EOSINOFÍLICO LEVEMENTE FIBRILAR OU CORPÚSCULOS GLOBULARES, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	31
FIGURA 4 – OVINO, SCRAPIE, VACUOLIZAÇÃO DA NEURÓPILA, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	32
FIGURA 5 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLO PEQUENO NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	33
FIGURA 6 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLOS PEQUENOS E DUPLOS NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	34
FIGURA 7 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLO MÉDIO NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	34
FIGURA 8 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLO GRANDE NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	35
FIGURA 9 – OVINO, SCRAPIE, VACÚOLO GRANDE NO PERICÁRIO NEURONAL, COLORAÇÃO DE HE, AUMENTO 40X.....	35

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – PORTARIA Nº 516, DE 9 DE DEZEMBRO DE 1997, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA.....	57
ANEXO 2 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA.....	60
ANEXO 3 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 27 DE FEVEREIRO DE 2004, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA.....	67
ANEXO 4 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 2 DE ABRIL DE 2008, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA.....	77

RESUMO

Scrapie ou Paraplexia Enzoótica dos Ovinos é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, caracterizada por vacuolização no sistema nervoso central (SNC). Os principais sinais clínicos incluem irritação da pele, alterações de comportamento, perda de peso, tremores e ataxia. A doença ocorre de forma natural nos animais, é conhecida a mais de 250 anos, apresenta um longo período de incubação e suas vias de contaminação não estão completamente esclarecidas.

Scrapie é uma doença de notificação obrigatória, de acordo com as listadas pela OIE – Organização Mundial da Saúde Animal (anteriormente classificadas em listas de Doenças A e B). Vários aspectos relacionados às questões econômicas, entre eles custos e perdas em rebanhos contaminados e, particularmente, devido a restrições de comercialização e exportação em função das barreiras sanitárias decorrentes de acordos internacionais firmados entre o Brasil e vários países, reforçam a importância do estudo desta doença.

Visando o esclarecimento da situação do rebanho ovino da região sul do Brasil, especialmente do estado do Paraná, com relação à ocorrência e diagnóstico de Scrapie, foi proposto o estudo histopatológico e imuno-histoquímico em uma população de ovinos previamente diagnosticada com Scrapie nesta região. As lesões histológicas, os resultados obtidos com a técnica de imuno-histoquímica e a comparação dos resultados entre estes dois métodos são discutidos neste trabalho.

Palavras-chave: Scrapie. Vacúolos. Sistema nervoso central. Ovinos.

ABSTRACT

Scrapie is a neurodegenerative, progressive and fatal disease of sheep and goats that is characterized by vacuoles in the central nervous system (CNS). The main clinical signs include pruritis, changes in behaviour, weight loss, trembling, and ataxia. The disease occurs naturally in animals and it is known for more than 250 years. It has a long incubation period and its transmission routes are not fully understood.

It is of mandatory notification since it comprises the list of the OIE – Office of International Epizooties / The World Organisation for Animal Health (formerly list A and B – OIE). Many economic aspects emphasize the importance of study this disease. These aspects include high cost and losses with infected flocks especially because of commercial restrictions due to sanitary barriers of international trade between Brazil and many countries.

With the objective of elucidate the disease status concerning the occurrence and diagnosis of Scrapie in Southern Brazilian flock, mainly in the Paraná state a histopathology and immunohistochemistry study was designed. The histological lesions, the immunohistochemical results and comparison between these two diagnostic methods are discussed in this present work.

Key words: Scrapie. Vacuoles. Central nervous system. Ovine.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE QUADROS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ANEXOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS.....	13
2.2 PRIONS.....	14
2.3 SCRAPIE.....	16
2.3.1 Epidemiologia.....	17
2.3.2 Transmissão.....	18
2.3.3 Patogenia.....	20
2.3.4 Sinais clínicos.....	20
2.3.5 Diagnóstico.....	21
2.3.5.1 Diagnóstico pré-clínico.....	23
2.3.6 Scrapie atípico.....	23
2.4 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA EM OVINOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

Scrapie ou Paraplexia Enzoótica é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal de ovinos e caprinos, que ocorre de forma natural, e é conhecida a mais de 250 anos. Caracteriza-se por lesões de vacuolização no sistema nervoso central (SNC). Os principais sinais clínicos são irritação da pele, mudanças no comportamento e postura do animal, perda de peso, incoordenação motora e ataxia. A doença caracteriza-se por um longo período de incubação e suas vias de contaminação não estão completamente esclarecidas. Por ser uma doença da lista da OIE (Organização Mundial da Saúde Animal), é de notificação obrigatória.

A Scrapie é o protótipo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) ou doenças priônicas. As doenças priônicas se apresentam como desordens infecciosas, esporádicas e/ou hereditárias, caracterizadas pelo acúmulo da isoforma anormal patogênica (PrP^{Sc}) da proteína priônica (PrP^{C}) em alguns tecidos dos animais infectados. Outros tipos de doenças causadas por príons como a Doença Debilitante Crônica dos Cervos e Alces, a Encefalopatia Espongiforme dos Ruminantes Silvestres, a Encefalopatia Espongiforme Felina e a Encefalopatia da Marta ou Vison podem acometer outras espécies animais.

Doenças neurodegenerativas que afetam o homem e têm características similares ao Scrapie também são descritas, como o Kuru, a doença de Creutzfeldt-Jacob (CJD), a doença de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), a Insônia Familiar Fatal e a Síndrome de Alpers.

Devido à ausência de evidências epidemiológicas ou clínicas de associação entre Scrapie e as encefalopatias humanas, a Scrapie é considerada não patogênica para humanos. Entretanto, a resistência do PrP^{Sc} a desinfetantes e o fato de ele poder ser transmitido experimentalmente a diversas espécies de mamíferos, sugerem prudência às pessoas em se exporem ao agente.

Em 1986, o aparecimento de uma epidemia denominada Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), que acometeu o gado bovino da Grã-Bretanha, foi associada ao uso de vísceras de ovelhas contaminadas com Scrapie no preparo da ração usada para alimentar estes animais. Desde então há uma contínua discussão sobre a possibilidade de sua transmissão para o homem através da ingestão de carne e produtos de origem animal proveniente de animais afetados. Esta sugestão foi dada após o aparecimento de alguns casos de CJD, que foram denominados de

nova variante e que tinham como principal característica o acometimento de indivíduos muito jovens que ingeriam carne bovina regularmente. O estabelecimento da ligação entre a Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) e a variante da doença de Creutzfeldt-Jacob (vCJD), nivelou o PrP^{Sc} da Scrapie aos agentes análogos causadores de encefalopatias espongiformes em humanos e animais com relação ao seu potencial zoonótico.

Sob condições experimentais, ovelhas são facilmente infectadas por via oral, pelo PrP^{Sc} de EEB, e apresentam sinais clínicos e resultados laboratoriais indistinguíveis aos de Scrapie. Uma vez que os ovinos podem ser expostos às mesmas fontes de contaminação que os bovinos, o ovino portador de EEB pode ser erroneamente diagnosticado com Scrapie, e a negligência de cuidados representa potencial perigo para os humanos.

Desde seu primeiro relato em 1998, um número crescente de casos de Scrapie com características atípicas, designado Nor98, tem sido diagnosticado na Noruega. Os casos de Nor98 diferem dos casos de Scrapie clássica e de EEB em várias características, incluindo a distribuição neuroanatômica das lesões histopatológicas e da PrP^{Sc} no encéfalo, e o padrão dos depósitos da PrP^{Sc} (Moum *et al.*, 2005). A partir de 2003 uma forma atípica de Scrapie, com perfil semelhante ao descrito para a Nor98, foi identificada em vários países.

Paralelamente, em relação à ocorrência natural da EEB nos pequenos ruminantes, foi confirmado um caso em um caprino na França (ELOIT *et al.*, 2005), o que fez com que os pequenos ruminantes, que anteriormente não eram assunto de saúde pública quando se tratavam de EETs, novamente tornassem a ser alvo de preocupações.

Adicionalmente, são relevantes os aspectos relacionados às questões econômicas, pelos custos e perdas em rebanhos contaminados e particularmente pelas restrições de comercialização e exportação em função das barreiras sanitárias decorrentes de acordos internacionais firmados entre o Brasil e vários países, assim como os relacionados à saúde e bem estar animal, pelos animais doentes.

Visando o esclarecimento da situação do rebanho ovino da região sul do Brasil, especialmente do estado do Paraná, com relação à ocorrência e diagnóstico de Scrapie, propõe-se o estudo histopatológico e imuno-histoquímico em uma população de ovinos previamente diagnosticada com Scrapie nesta região.

Os objetivos específicos são:

1. Relacionar e descrever lesões histológicas observadas na técnica de hematoxilina e eosina condizentes com Scrapie nos animais encaminhados para diagnóstico histopatológico no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.
2. Determinar por meio da técnica de imuno-histoquímica a presença do agente infeccioso da Scrapie.
3. Comparar os resultados obtidos na técnica de hematoxilina e eosina e na técnica de imuno-histoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS

As Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) são doenças degenerativas, de lenta progressão, invariavelmente fatais e que afetam o sistema nervoso central de vários mamíferos. Comum a todas as EETs é o acúmulo de uma forma patológica da proteína priônica (PrP^C) normal do hospedeiro (HUNTER, 1997). As EETs têm como característica longos períodos de incubação, assintomáticos, que podem durar meses ou anos (PRUSINER, 2004).

Em humanos, encefalopatias espongiformes como a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ), Kuru, Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, a Síndrome de Alpers e a Insônia Familiar Fatal são descritas. As doenças em animais - Scrapie, Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB), Encefalopatia da Marta ou Vison, Encefalopatia Espongiforme Felina, a Doença Consumptiva (ou Debilitante) Crônica dos Cervos e Alces e a Encefalopatia Espongiforme dos Ruminantes Silvestres - completam a lista, formando o elenco de EETs. Por admitirem o prion como agente causal comum, são agrupadas sob a designação de Doenças Priônicas (PRUSINER, 1998).

As encefalopatias espongiformes constituem um tema de grande importância na atualidade devido à aparição de uma nova doença, denominada variante de Creutzfeldt-Jakob (vDCJ). Hoje há evidências suficientes de que a vDCJ é causada pelo agente da EEB e imagina-se que a transmissão desta doença dos bovinos aos humanos ocorreu por meio de infecção pelo agente da EEB na alimentação (WILL, 2006). Os primeiros casos da EEB ocorreram em vacas leiteiras suplementadas com proteínas de origem animal, contaminadas com o agente do scrapie, em 1985 (WELLS *et al.*, 1987).

No caso do Scrapie, é importante lembrar que existe uma barreira de espécie que limita a transmissão das EETs entre indivíduos de diferentes espécies. Ainda que esta barreira possa ser atravessada, como ocorreu com a EEB, considera-se que o Scrapie não afeta os humanos (DETWILER e BAYLIS, 2003; PRUSINER *et al.*, 2004). No entanto, é necessário um controle rigoroso da presença do scrapie para limitar ao máximo a possível disseminação do agente infeccioso. Da mesma forma, a possibilidade de que EEB possa ter infectado a população ovina no Reino Unido não pode ser descartada, de tal modo que a análise detalhada das EET no

rebanho ovino supõe um assunto de grande interesse desde o ponto de vista de saúde animal e, principalmente, saúde pública (ESPINOSA *et al.*, 2004).

2.2 PRIONS

Prions são proteínas infecciosas (PRUSINER, 2004). O termo prion denomina o agente infeccioso de uma série de doenças, caracterizadas por neurodegeneração espongiiforme e proliferação de células da glia.

PRUSINER (1982) estabeleceu, pela primeira vez, que uma macromolécula específica, uma proteína, era necessária para a infectividade e propôs o termo “*prion*” (dos termos em inglês: *proteinaceous* e *infectious*) para denotar estas pequenas partículas protéicas infecciosas, resistentes a tratamentos que modificam ácidos nucleicos.

Logo depois, BOLTON *et al.* (1982), por meio de purificação destas proteínas infecciosas (prions), a partir de cérebro de hamster infectado com scrapie, identificaram uma proteína com massa molecular variando de 27 a 30 kDa. Esta proteína apresentou resistência a tratamento com proteinase K (PK), podendo ser detectada em cérebro de animais infectados após digestão com esta enzima, mas não foi detectada em cérebro de animais sadios submetido ao mesmo tratamento. Sob ação da proteinase K, 67 aminoácidos da região N-terminal da proteína são degradados resultando na molécula que ficou conhecida como PrP^C 27-30, devido a variação de sua massa molecular. PrP^C 27-30 corresponde então à porção da proteína prion scrapie que é resistente a PK e capaz de manter infectividade (PRUSINER, 1998).

Mais tarde, o gene para esta proteína foi identificado e sua sequência não apresentou nenhuma diferença entre animais infectados e sadios (BASLER *et al.*, 1986). Esses dados mostram que a proteína priônica causadora do Scrapie é codificada no genoma do próprio hospedeiro independentemente da doença e, portanto, sugere que eventos pós-traducionais seriam responsáveis pelas diferenças entre a isoforma celular e a isoforma relacionada à doença. À forma normal, não-causadora de doença, denominou-se PrP^C (PrP celular) e a forma patogênica foi chamada de PrP^{Sc} (PrP Scrapie) (Figura 1).

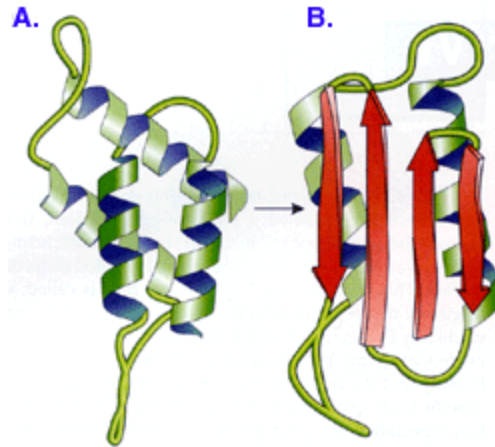


Figura 1 – Estrutura secundária das isoformas da proteína priônica.

a) PrP^C com estruturas predominantes em α hélices

b) PrP^{Sc} com estruturas predominantes em β folha

Fonte: disponível em www2.lifl.fr/~touzet/M1/TP1/tp1.html

Quanto à conversão da forma normal em patogênica, sabe-se que as duas isoformas de PrP apresentam a mesma sequência primária, sendo que a conversão de PrP^C para PrP^{Sc} representa uma alteração exclusivamente conformacional, onde uma interação física bastante específica deve ocorrer entre as duas isoformas para que haja propagação de PrP^{Sc} durante o processo de infecção (PRUSINER, 1998; HARRIS, 1999).

O prion do Scrapie é uma proteína hidrófoba, glicosilada, protease-resistente, com 27 a 30 kDa, constituída por uma única cadeia polipeptídica de 256 aminoácidos. O gene da PrP, PRNP, é um gene cromossômico de cópia única, localizado no cromossomo 13, muito similar nas distintas espécies de mamíferos, apresentando uma homologia de sequência de 80 a 90% (LEE *et al.*, 1998). Sua expressão é constitutiva em quase todos os tecidos do organismo adulto, sendo sua expressão máxima nos tecidos neuronais, fundamentalmente no cérebro, cerebelo, medula e hipotálamo.

De forma geral, todos os prions possuem características bastante diferentes dos agentes infecciosos convencionais, tais como: filtrável com poros de 25 nm; invisível ao microscópio óptico e eletrônico; inativado com condições muito intensas (autoclave >134°C - 20 minutos, hipoclorito sódico 50%, hidróxido sódico 2N, fenol 90%); resistente a formaldeído, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), proteases (tripsina, pepsina), nucleases, radiação ultravioleta e radiação ionizante; não produzem resposta inflamatória; não são antigênicos; causam doença crônica

progressiva e fatal em todos os casos com longo período de incubação (meses, anos); não apresentam ácido nucléico e têm como único componente a proteína PrP; podem existir em múltiplas formas moleculares; apresentam um controle genético da susceptibilidade em algumas espécies e distintas cepas são identificáveis (ESPINOSA *et al.*, 2004) (Quadro 1).

Quadro 1 – Características da forma normal e anormal da proteína priônica (PrP)

	PrP normal	PrP anormal
Nomenclatura	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Proteinase K (PK)	Sensível	Parcialmente resistente
Comprimento	~250 aminoácidos	~250 aminoácidos
Estrutura predominante	α hélices e <i>loops</i>	β folha
Glicosilada	Dois sítios	Dois sítios
Peso molecular (-PK)	33-35 kDa	33-35 kDa
Peso molecular (+PK)	Degradada	27-30 kDa
Localização	Superfície celular, ancorada por GPI	Fibrilas, deposição
Expressão	Muitos tecidos	Cérebro, SNC, tonsilas, linfonodos, baço,
Expressão na doença	Níveis protéicos constantes	Níveis protéicos aumentam
<i>Turnover</i>	Rápido	Lento
Infectividade com scrapie	Não co-purifica	Co-purifica

Fonte: adaptado de HUNTER (1997).

2.3 SCRAPIE

O termo scrapie vem da palavra inglesa *scrape*, que tem o significado de raspar, arranhar ou esfolar. Apesar de ser conhecida desde o século 18 e dos recentes avanços na área de pesquisa, principalmente impulsionados pelo advento da EEB, muitos aspectos do Scrapie ainda permanecem parcialmente ou totalmente desconhecidos. DETWILER e BAYLIS (2003) destacam que:

a) o agente etiológico da doença ainda não foi totalmente caracterizado;

- b) a patogênese do Scrapie não está totalmente entendida; um melhor conhecimento ajudaria a escolher tecidos alvo para fins diagnóstico, bloquear a progressão ou prevenir a doença;
- c) nem todas as vias de transmissão e sua importância relativa são conhecidas, o que poderia ajudar a prevenir a disseminação da doença e a avaliar o risco de contaminação de ambiente e produtos;
- d) ainda que o conhecimento na área de genética do hospedeiro influenciando a resistência/susceptibilidade ao Scrapie tenha sido grandemente ampliado, informações essenciais ainda permanecem sem resposta, como: 1) se os genótipos que não apresentam evidências da doença clínica poderiam estar infectados e apresentar risco aos demais animais; 2) se o agente irá se adaptar aos genótipos mais resistentes tornando-se um problema no futuro;
- e) muitos avanços foram feitos nos testes diagnósticos, que permitem inclusive a confirmação em tecidos autolisados ou congelados e alguns testes têm apresentado os primeiros passos para o diagnóstico em animais vivos; porém, estas técnicas ainda não permitem o diagnóstico nos estágios mais iniciais da doença ou são extremamente difíceis em termos de logística;
- f) que métodos inativam totalmente o agente infeccioso;
- g) é o Scrapie a fonte da EEB?

2.3.1 Epidemiologia

O Scrapie nos ovinos é considerado uma doença endêmica em vários países da Europa, Canadá e Estados Unidos, sendo relatada em diversos países. Há quem considere que somente a Austrália e Nova Zelândia são livres da doença. Nos caprinos, existem relatos em vários países (Canadá, Chipre, Finlândia, França, Grécia, Itália, Suécia, Reino Unido e Estados Unidos), porém a incidência é consideravelmente menor que nos ovinos (DETWILER e BAYLIS, 2003).

No Brasil, o primeiro relato de Scrapie foi em 1978 em um ovino Hampshire Down, importado da Inglaterra (FERNANDES *et al.*, 1978). Em 1985, foi diagnosticado Scrapie em ovinos importados do Reino Unido. Estes animais ainda estavam em período de quarentena e, na oportunidade, foram sacrificados. Nos últimos anos, segundo a OIE, o Brasil teve casos relatados de Scrapie nos anos de 2000 (com 290 animais sacrificados), 2001 (com 238 animais sacrificados), 2003 (56 animais sacrificados) e 2005 (75 animais sacrificados) (<http://www.oie.int/hs2> e

http://www.oie.int/wahidprod/public.php?page=disease_status_detail). Há ainda casos que não constam na OIE, mas que estão publicados, como os casos de Scrapie em ovinos da raça Suffolk no Rio Grande do Sul em 1995, 1996 e 1997 (RIBEIRO, 1996; DRIEMEIER, 2001). Destes casos oficiais, os de 2000, 2001 e 2003 ocorreram em propriedades do Paraná. Desde o caso de 2003, considerado o primeiro caso autóctone do Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) vem trabalhando, inicialmente dentro do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos (PNSCO) e posteriormente no Programa Nacional de Controle da Raiva dos Herbívoros e Controle das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, num programa específico de controle do Scrapie (<http://www.mapa.br>).

O conhecimento da epidemiologia de uma doença é essencial o delineamento de estratégias de controle. Porém, no caso do Scrapie, a epidemiologia e particularmente os mecanismos de transmissão ainda não estão completamente entendidos (TOUZEAU *et al.*, 2006).

DETWILER e BAYLIS (2003) afirmam que a prevenção deve ser prioritária em países, regiões ou rebanhos onde o Scrapie não está presente. A rápida eliminação da doença, imediatamente após a introdução, é uma estratégia essencial se as medidas preventivas não foram eficientes. Falhas na prevenção ou eliminação permitem uma disseminação silenciosa do prion durante seu longo período de incubação (meses ou anos). Para aqueles países ou regiões em que a doença se tornou endêmica, esforços para eliminá-la têm atravessado décadas e, na maioria dos casos, não têm tido sucesso. As características da doença são a causa primária deste insucesso. Segundo BAYLIS (2006), a combinação de longo período de incubação e de muitas vias de transmissão, inclusive algumas ainda não bem conhecidas, faz com que as tentativas de controle do Scrapie por interferência nas vias de transmissão sejam totalmente ineficientes.

2.3.2 Transmissão

A transmissão do Scrapie ocorre em condições naturais (a doença é endêmica em muitos países do hemisfério norte), porém o modo de transmissão ainda não é totalmente conhecido (RYDER *et al.*, 2004). Durante muitos anos, presumiu-se que o Scrapie era transmitido da mãe para o cordeiro, devido ao relativo alto risco de cordeiros se tornarem infectados se eles nascessem de mães

afetadas, e reforçado pelos achados de infectividade da placenta e não de outras secreções ou excreções em animais acometidos (DETWILER e BAYLIS, 2003). Atualmente, é aceito que é a herança da susceptibilidade vinda da mãe, e não uma transmissão materna, que levam a esta alta incidência (RYDER *et al.*, 2004). Portanto, a transmissão vertical até pode acontecer, mas é mais provável que a contaminação ocorra logo após o nascimento, e não no útero. ANDRÉOLETTI *et al.* (2002), trabalhando com cordeiros de genótipo VRQ/VRQ, considerado o mais susceptível, nascidos de mães com placentas contendo o prion ou não, mas mantidos no mesmo ambiente, observaram a mesma incidência da doença em ambos os grupo de cordeiros, indicando que a contaminação ocorre após o nascimento.

RYDER *et al.* (2004) demonstraram, trabalhando com a introdução de ovinos adultos e livres de Scrapie em rebanhos contaminados, que a transmissão lateral é a mais importante via de infecção em ovinos adultos e jovens. O mecanismo da infecção natural é ainda desconhecido. Sabe-se que a transmissão horizontal acontece pela via oral, uma vez que os primeiros locais onde se detecta a presença do prion, em animais naturalmente contaminados, é no trato digestório, mais precisamente nas placas de Peyer (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000). A principal fonte de contaminação do ambiente por tecidos infectivos são placenta e fluidos fetais, levando a um aumento na transmissão do Scrapie durante a estação de nascimento (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2002; TOUZEAU *et al.*, 2006). Fluidos corporais como sangue, fezes, urina, sêmen e saliva são considerados como não contagiosos por alguns autores (DETWILER e BAYLIS, 2003). No entanto ERSDAL *et al.* (2005) e KOVACS e BUDKA (2008) relataram a possibilidade de transmissão de PrP^{Sc} no sangue de ovinos, tanto em condições naturais quanto experimentais. O agente do Scrapie tem sido detectado no SNC, glândulas salivares, tonsilas, linfonodos, membrana nictitante, baço, íleo distal, cólon proximal e músculos, sendo que a excreção urinária foi recentemente reportada em camundongos com nefrite e também em hamsters, mas não foi documentada em ovinos (KARIV-INBAL *et al.*, 2006).

Uma vez o ambiente contaminado, torna-se bastante complicada a eliminação do prion. LEITA *et al.* (2006) afirmam que existe uma forte interação da PrP^{Sc} com o solo, favorecendo seu acúmulo, especialmente se no solo forem colocados fertilizantes orgânicos ou quando carcaças de animais acometidos e placentas são

enterradas ou deixadas na superfície do solo. JOHNSON *et al.* (2006) acrescentam que a PrP^{Sc} se liga fortemente ao solo e minerais, permanecendo pelo menos por mais de 3 anos infectiva. GEORGSSON *et al.* (2006) citam um caso ocorrido na Islândia, onde a investigação epidemiológica leva a concluir que o agente permaneceu viável por 16 anos.

2.3.3 Patogenia

Apesar dos mecanismos patológicos relacionados não estarem bem definidos, a deposição de PrP^{Sc} nos tecidos correlaciona com a infectividade e esta deposição é atualmente o único marcador molecular específico para as infecções das EETs (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2000).

Em condições naturais, a infecção pelo agente do Scrapie acontece após uma contaminação pela via oral. De forma geral, o esquema de disseminação ocorre da seguinte forma: logo após a infecção, o acúmulo da PrP^{Sc} torna-se detectável nas placas de Peyer. Então a PrP^{Sc} dissemina-se progressivamente para todas as estruturas linfóides secundárias. Neste ponto de replicação, a infecção chega ao Sistema Nervoso Entérico (SNE), e invade o SNC, aparentemente através dos tratos nervosos autonômicos (ANDRÉOLETTI *et al.*, 2006).

O genótipo do hospedeiro tem importante papel na patogenia do prion. Em cordeiros VRQ/VRQ, considerado o genótipo mais susceptível ao Scrapie, é possível detectar a presença de acúmulo de PrP^{Sc} nas placas de Peyer com apenas 2 meses de idade. Em seguida, ocorre a replicação no GALT: tecido linfóide associado ao intestino (*do termo em inglês: gut-associated lymphoid tissues*), sendo a PrP^{Sc} detectável neste tecido entre os 3 e 6 meses de idade. A passagem do sistema linfóide para o sistema nervoso (SN) ocorre nas fibras nervosas que inervam estes tecidos linfóides, disseminando-se pelo SN Mesentérico Autonômico. Segue até o SNC através de um caminho axonal, o núcleo parassimpático do Nervo Vago, sendo que aos 9 meses já possível a detecção da PrP^{Sc} neste tecido (ANDRÉOLETTI, *et al.*, 2000).

2.3.4 Sinais clínicos

Nos ovinos, a doença clínica se manifesta como uma desordem não febril, crônica, progressiva, neurodegenerativa e fatal. Os principais sinais clínicos que são relatados estão associados a uma irritação na pele, mudanças de comportamento,

na postura e movimentação e perda de peso. Os sinais clínicos podem variar e alguns animais não apresentam um quadro típico (COCKCROFT e CLARK, 2006).

Segundo DICKINSON (1976), os sinais começam com uma modificação do comportamento social, seguido de incoordenação motora ou ataxia, com discretos tremores e grande prurido, o que leva os animais a se coçarem continuamente, esfregando-se em árvores, cercas ou mesmo mordendo as partes afetadas. As lesões ocasionadas pelo ato de se coçarem podem ser muito extensas, com grandes áreas de perda de lã. Apesar de o animal continuar se alimentando, há perda de peso progressiva.

LAMPERT *et al.* (1972) descrevem que nas primeiras fases, os animais somente apresentam ligeiras alterações do comportamento, mostrando-se nervosos, agressivos ou isolados do rebanho. Mais tarde começam a incoordenação motora (passadas altas nos membros anteriores e saltos de coelhos nos posteriores) e os tremores. Outros sinais podem incluir déficit propioceptivo, bruxismo, tetraparesia, perda do reflexo de ameaça, nistagmo, vômito, disfonia e timpanismo ruminal.

A duração dos sinais clínicos é muito variável, podendo ser de 2 semanas a 6 meses. Períodos de estresse podem coincidir com o início dos sinais clínicos, ou exacerbar a severidade dos mesmos (COCKCROFT e CLARK, 2006).

O período de incubação é também bastante variável, de 1 a 7 anos (ESPINOSA *et al.*, 2004) e ,experimentalmente, o período de incubação varia de 1 a 4 anos (HUNTER, 1997).

2.3.5 Diagnóstico

A detecção de PrP^{Sc} é o método mais específico, sensível e confiável para o diagnóstico da doença em qualquer animal (PRUSINER *et al.*, 2004). PrP^{Sc} somente é encontrada nas doenças priônicas e, assim, a sua presença em ovinos e caprinos é diagnóstica da infecção priônica. A histopatologia, por sua vez, pode ser bastante variável, com vacuolização da neurópila e astrogliose reativa variando consideravelmente na intensidade e localização.

Segundo JEFFREY (2006), a literatura ainda apresenta as lesões histológicas de Scrapie como vacuolização, astrocitose e perda neuronal, embora nenhuma das três alterações esteja invariavelmente presente nos casos clínicos de Scrapie e que a perda neuronal seja raramente observada histologicamente. As alterações espongiiformes da neurópila são comumente encontradas no Scrapie clássico, mas a

distribuição neuroanatômica da vacuolização na substância cinzenta e a proporção da vacuolização da neurópila e intra-neuronal são altamente variáveis. Alguns casos clínicos de Scrapie podem demonstrar poucas evidências de vacuolização e, em algumas situações, não se detecta vacuolização no cérebro de animais clinicamente afetados (ERSDAL *et al.*, 2003).

A detecção da doença associada com acúmulo de proteína priônica pelas técnicas de *immunoblotting* ou imuno-histoquímica (IHQ) é a forma mais confiável para demonstrar a presença da infecção. Há também evidências de que o acúmulo de PrP^{Sc} no tecido nervoso é prévio à neurodegeneração espongiiforme (DeARMOND e PRUSINER, 1993; JEFFREY *et al.*, 2001), o que permite que estes métodos possam diagnosticar as ETTs antes do aparecimento de sinais clínicos e também nos casos em que as lesões neuropatológicas são mínimas ou ausentes. Ambos os métodos podem ser utilizados para identificar PrP anormal nos tecidos linfóides, no trato alimentar e nos sistemas nervoso periférico e autônomo. O grau em que tecidos periféricos estão envolvidos no Scrapie clássico é influenciado pela dose, genótipo e cepa (JEFFREY, 2006).

Esses testes se baseiam no uso de anticorpos específicos, não necessariamente capazes de distinguir entre as duas isoformas de PrP. Portanto, previamente à detecção de PrP^{Sc} é necessário degradar a PrP^C, geralmente com proteinase K (PK). Estão sendo desenvolvidos alguns anticorpos que detectam epítomos específicos da PrP^{Sc}, possível pela alteração conformacional da proteína no momento de conversão da isoforma PrP^C para a PrP^{Sc}, expondo epítomos que na forma normal (celular) permanecem ocultos (PARAMITHIOTIS *et al.*, 2003).

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

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

2.3.5.1 Diagnóstico pré-clínico

Os testes diagnósticos para EETs podem ser divididos em testes *ante* (e preferencialmente pré-clínico) e *post-mortem*. Todos os testes diagnósticos usados hoje em dia, baseiam-se na detecção da proteína priônica associada à doença. PrP^{Sc} pode ser detectada no SNC de bovinos em um tempo próximo à doença clínica, mas bem antes em ovinos e caprinos, ainda no período de incubação. Dependendo do genótipo, a PrP^{Sc} pode também ser detectada fora do SNC. Portanto, um diagnóstico pré-clínico pode ser realizado em ovinos e caprinos, mas não em bovinos (GROSCHUP, 2006).

A biópsia da terceira pálpebra foi o primeiro passo para um possível diagnóstico pré-clínico, não invasivo, em ovinos (O'ROURKE *et al.*, 1998a, O'ROURKE *et al.*, 2000). O tecido linfóide presente nesta região é facilmente retirado para biópsia, sob anestesia local.

Segundo GONZÁLEZ (2006), o diagnóstico em animais vivos, assintomáticos, está restrito a biópsias de tonsila palatina ou terceira pálpebra, mas que exigem procedimentos pouco práticos de serem realizados a campo. Porém, mais recentemente, tem sido testada a técnica de diagnóstico pré-clínico em amostras da mucosa retal, por meio de provas imuno-histoquímicas da presença de PrP^{Sc} no tecido linfóide associado à mucosa retoanal (GONZÁLEZ *et al.* 2005; ESPENES *et al.*, 2006). Em animais com diagnóstico positivo por IHQ no SNC ou em outros tecidos linforreticulares, o método apresentou 97% de sensibilidade, não detectando apenas aqueles animais cuja IHQ era positiva para SNC e não para os outros tecidos linfóides. Em 100% dos casos negativos para os outros órgãos ou tecidos, a IHQ da mucosa retal também foi negativa (GONZÁLEZ *et al.* 2005).

2.3.6 Scrapie atípico

Um novo tipo de Scrapie, denominado Nor98, foi diagnosticado na Noruega pela primeira vez em 1998 (BENESTAD *et al.*, 2003). Estes casos provavelmente representam o maior grupo de casos atípicos de Scrapie, relatados em vários países europeus. O Nor98 difere claramente do Scrapie clássico em muitos aspectos e desafia o diagnóstico da doença. Os casos do Nor98 têm menor quantidade e menos PrP^{Sc} no tecido encefálico que os casos de Scrapie clássico. Essas características poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o porquê de alguns

testes rápidos apresentarem problemas em detectar a maioria dos casos de Nor98 (BENESTAD *et al.*, 2006).

Os casos atípicos, primeiramente identificados na Noruega (BENESTAD *et al.*, 2003; MOUM *et al.* 2005), após a implantação de vigilância ativa de EETs também foram identificados em outros países: França e Alemanha (BUSCHMANN *et al.*, 2004), Suécia (GAVIER-WIDEN *et al.*, 2004), Portugal (ORGE *et al.*, 2004), Irlanda (ONNASCH *et al.*, 2004), Bélgica (De BOSSCHERE *et al.*, 2004), Reino Unido (SAUNDERS *et al.*, 2006) e Ilhas Malvinas (EPSTEIN *et al.*, 2005).

São muitas as diferenças entre os casos atípicos designados Nor98 e os casos clássicos: distribuição neuroanatômica das lesões histopatológicas no encéfalo e padrão de deposição da PrP^{Sc}. A distinção entre os dois tipos se baseia nestas características e é confirmada pela observação do perfil eletroforético da Nor98 na técnica de *Western blot*, caracterizado por uma rápida migração de uma banda de aproximadamente 12 KDa (BENESTAD *et al.*, 2003).

Clinicamente, nos casos atípicos os sinais mais comuns são ataxia e incoordenação, ansiedade e mudança de comportamento, e perda de peso. O prurido, bastante comum nos casos clássicos de Scrapie, não é observado, mas os sinais podem ser vagos ou ausentes (BENESTAD *et al.*, 2006). O aparecimento dos sinais clínicos geralmente ocorre em torno de 6 anos, variando de 36 a 100 meses de idade (MOUM *et al.*, 2005).

As alterações histopatológicas e a coloração imuno-histoquímica no encéfalo não estão presentes nas áreas de referência para o Scrapie clássico, que seriam a região do óbex da medula oblonga e especialmente o Núcleo Motor Dorsal do Nervo Vago. Quando presente, a vacuolização e a coloração da IHQ são mais pronunciadas no córtex cerebelar e cerebral, indicando que amostras do cerebelo, em adição à área do óbex, são essenciais para o diagnóstico dos casos de Scrapie Nor98 (BENESTAD *et al.*, 2006).

A presença esporádica de casos únicos de Scrapie atípico nos rebanhos, sem prévio contato, levou à especulação de que estes casos atípicos, apesar do Scrapie ser considerado como uma doença infecciosa, pudessem ser espontâneos, como acontece na DCJ esporádica em humanos (BENESTAD *et al.*, 2003; NÖREMARK, 2006).

2.4 ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA EM OVINOS

A epidemia de EEB, iniciada em 1986 e com o pico em 1992, resultou em torno de 185 mil bovinos clinicamente e fatalmente acometidos. Aproximadamente 3 milhões de animais infectados que ainda estavam na fase pré-clínica foram abatidos e entraram na cadeia alimentar humana no Reino Unido e em outras localidades. A transmissão de EEB para o homem causou a vDCJ em mais de 170 pessoas no Reino Unido, mas também na França, Itália, Japão e outros lugares. Como medida preventiva na União Européia, o risco de exposição humana a EEB é minimizado pelo teste rápido de todo bovino com mais de 30 meses de idade e pela remoção dos materiais de risco específico da carcaça de animais que são considerados como possivelmente infectantes para EEB (GROSCHUP, 2006).

Durante os anos 80, farinha de carne e ossos (MBM - *meat and bone meal*) contaminada com EEB foi fornecida para ovinos, levantando a possibilidade de EEB ter sido transmitida para o rebanho ovino britânico. A partir da comprovação da transmissão experimental de EEB para ovinos, pelo desafio oral de apenas 0,5 g de material cerebral bovino contaminado (STACK, 2006), o consumo de carne e derivados ovinos tornou-se um risco potencial para a saúde humana.

BELLWORTHY *et al.* (2005) demonstraram experimentalmente que, em animais de genótipo ARQ/ARQ, a doença já podia ser identificada 4 meses após a dose oral nos linfonodos retrofaríngeos e nas placas de Peyer e, aos 10 meses, a infecção já estava disseminada pela carcaça. Os sinais clínicos foram observados entre 628 e 1132 dias. No SNC, o padrão de disseminação da PrP^{Sc} e a vacuolização eram similares ao Scrapie. A doença induzida pela infecção experimental foi indistinguível do Scrapie.

Exames que podem diferenciar o Scrapie de EEB são *western immunoblotting*, *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) e imuno-histoquímica (JEFFREY *et al.*, 2001; GONZÁLEZ *et al.*, 2003). A partir de 2001 todo o animal positivo para Scrapie tem que ser testado para EEB, de acordo com nova regulamentação da União Européia (EU, 2001). Até o momento, existem registros de 2 ovinos suspeitos e um caprino confirmado de contaminação natural por EEB (ELOIT *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Em abril de 2006, todo o rebanho ovino (118 animais) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC) foi abatido e órgãos dos animais foram colhidos para posterior análise histológica de rotina e por imuno-histoquímica (IHQ), para a presença do prion.

Este rebanho era composto por dois grupos de animais: 53 animais puros da raça Hampshire Down (HD) e 75 animais mestiços, com diferentes graus de sangue das raças Texel, Ile de France, Hampshire Down e mesmo animais sem raça definida (SRD) e, ainda, 5 animais mestiços das raças Crioula (2), Ideal, Corriedale e Karakul. Reprodutores puros da raça HD eram utilizados nos cruzamentos das fêmeas mestiças. Do rebanho puro, exceto por quatro ovelhas mais velhas (nascimento entre 1997 e 1999) e o reprodutor, todos os demais animais eram nascidos na propriedade. Já dos 75 animais mestiços, 33 (44%) foram comprados de outras propriedades, nos anos de 2002 e 2003, e o restante era nascido no Setor de Ovinocultura da PUC-PR.

O abate dos animais foi realizado no Frigorífico Argus, São José dos Pinhais, PR. Encéfalo; terceira pálpebra, tonsilas, íleo e baço foram fixados em formalina 10% tamponada. Fragmentos de encéfalo foram processados rotineiramente para avaliação histológica no Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti – Área de Patologia Animal. Terceira pálpebra, tonsilas, íleo, baço e seções adicionais do óbex foram analisadas por imuno-histoquímica, segundo técnica definida pelo MAPA (BRASIL, 2004) pelo Laboratório de Referência em Diagnósticos de Doenças Priônicas, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para a análise pela técnica de imuno-histoquímica, as amostras e os controles positivo e negativo da prova foram submetidos às seguintes etapas:

- Fixação em formalina 10%;
- Clivagem;
- Descontaminação em ácido fórmico 95-98% (60 minutos);
- Lavagem em água destilada;
- Banho de re-equilíbrio em formalina 10% tamponada (24 horas).
- Desidratação em: álcool 95% (1 hora) por 3 vezes e álcool absoluto (1 hora) por 2 vezes;
- Diafanização em xilol (1 hora) por 3 vezes;

- Impregnação por parafina (1,5 horas) por 2 vezes;
- Inclusão em parafina a 58° C - 65°C;
- Corte histológico (4 a 6 micrômetros) em lâminas tipo Probe On Plus;
- Desparafinização a 65°C (20 minutos);
- Re-hidratação em: xilol (5 minutos); álcool absoluto (2 minutos); álcool 95% (2 minutos); álcool 80% (2 minutos); álcool 70% (1 minuto);
- Bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio e metanol 3%, preparada antes do uso a 22°C - 25°C (10 minutos);
- Lavagem em água bidestilada por 4 vezes;
- Incubação, para ativação do antígeno, em solução de ácido fórmico 95% e 22°C - 25°C (5 minutos);
- Rápida lavagem e neutralização em tampão Tris-HCl por 3 vezes;
- Lavagem em tampões frescos Tris-HCl (1 minuto, cada) até pH final do lavado entre 7 e 8;
- Autoclavagem em recipiente com solução tampão, envolto em papel alumínio, a 121°C (20 minutos); a contagem do tempo é iniciada quando a temperatura atinge 121°C;
- Lavagem em tampão Tris com Tween 20 (TBST) (10 minutos);
- Aplicação de proteinase K (concentração final de 250 µg/mL) sobre o corte na lâmina;
- Incubação (1,5 minutos);
- Lavagem em TBST (20 segundos) por 3 vezes;
- Aplicação do anticorpo monoclonal F89/160.1.5 (O'ROURKE *et al.*, 1998b), diluído conforme recomendações do fabricante;
- Incubação (10 minutos);
- Lavagem em TBST (20 segundos) por 3 vezes;
- Aplicação de 100 µl do complexo biotina-IgG anti-camundongo;
- Incubação a 22°C - 25°C (10 minutos);
- Lavagem em TBST (20 segundos) por 3 vezes;
- Aplicação de 100 µl da peroxidase-estreptavidina;
- Incubação a 22°C - 25°C (10 minutos);
- Lavagem em TBST (20 segundos) por 3 vezes;
- Aplicação do substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB);
- Incubação (4 a 5 minutos);

- Lavagem em água destilada (20 segundos) por 2 vezes;
- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris (30 segundos para tecidos linfóides e 10 minutos para encéfalo);
- Lavagem em água destilada (20 segundos) por 2 vezes;
- Imersão em banho com solução de hidróxido de amônio 37 mM (5 vezes);
- Lavagem em água destilada (20 segundos) por 2 vezes;
- Imersão em água até a montagem das lâminas com lamínulas;
- Desidratação em: álcool 70% (2 minutos); álcool 80% (2 minutos); álcool 95% (2 minutos); álcool absoluto (2 minutos);
- Diafanização em xilol (5 minutos) por 2 vezes;
- Montagem das lâminas para fixação das lamínulas com bálsamo sintético;
- Leitura em microscópio óptico.

Para a análise pela técnica histológica de rotina, com a coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), as amostras (n=118) foram submetidas às seguintes etapas:

- Fixação em formalina 10%;
- Clivagem;
- Desidratação em: álcool 95% (1 hora) por 3 vezes; álcool absoluto (1 hora) por 2 vezes;
- Diafanização em xilol (1 hora) por 3 vezes;
- Impregnação por parafina (1,5 horas) por 2 vezes;
- Inclusão em parafina a 58° C - 65°C;
- Corte histológico (3 a 4 micrômetros);
- Coloração: xilol (5 minutos);
 - xilol (5 minutos);
 - álcool absoluto (2 minutos);
 - álcool 95% (2 minutos);
 - álcool 80% (2 minutos);
 - álcool 70% (2 minutos);
 - água corrente (lavagem);
 - Hematoxilina de Harris (20 a 40 segundos);
 - água corrente (lavagem);
 - solução de hidróxido de amônia 37 mM (imersão até azular);
 - água corrente (lavagem);

Eosina (1 a 2 minutos);
álcool 70% (rápida passagem);
álcool 80% (rápida passagem);
álcool 95% (rápida passagem);
álcool absoluto (5 minutos) por 2 vezes;
xilol (5 minutos) por 2 vezes

- Montagem das lâminas para fixação das lamínulas com bálsamo sintético;
- Leitura em microscópio óptico.

Para a avaliação histológica foram selecionadas as áreas neuroanatômicas nas quais as lesões de Scrapie são mais frequentemente encontradas, situadas no tronco encefálico. As regiões do tronco encefálico examinadas corresponderam a secções do bulbo (medula oblonga) no nível do óbex, ponte no nível dos pedúnculos cerebelares caudais (posteriores), e mesencéfalo (duas secções), incluindo o colículo caudal (tubérculos quadrigêmeos inferiores) e o colículo rostral (tubérculos quadrigêmeos superiores).

As lâminas histológicas obtidas foram examinadas para pesquisa de lesões microscópicas compreendendo duas apresentações de vacuolização neuronal, na neurópila e no pericário neuronal. A microcavitação na neurópila corresponde à presença de vacúolos nos neuritos e é interpretada como alteração espongiiforme, não tendo sido, no presente estudo, quantificada. Da mesma forma a presença de gliose, esferóides axonais e amilóide foram igualmente descritas, mas também não foram quantificadas.

Os vacúolos presentes no pericário neuronal foram classificados em categorias, considerando-se sua dimensão e sua delimitação. As categorias compreendem, quanto à dimensão: vacúolos pequenos (com 7 a 10 μm de diâmetro), médios (10 a 30 μm de diâmetro) e grandes (com 30 a 40 μm de diâmetro); quanto à delimitação classificam-se em: com bordos bem definidos e com bordos pouco definidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSEs) são caracterizadas por dois tipos de alterações vacuolares limitadas à substância cinzenta. Uma é a vacuolização dos processos neuronais, observada como espongiose ou vacuolização na neurópila, e o outro tipo é a vacuolização dos corpos neuronais, observada como vacúolos únicos ou múltiplos no pericário dos neurônios (GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005).

Na avaliação histopatológica do sistema nervoso central dos ovinos estudados, vacuolização neuronal foi observada em 50 amostras (42,38%). Duas apresentações de vacuolização foram observadas, ocorrendo tanto no pericário neuronal como nos processos neuronais. Na neurópila, havia vacúolos nos axônios e dendritos, redondos ou ovais, com até 20 µm de diâmetro e que, quando abundantes, conferiam um aspecto esponjoso à neurópila (*status spongiosus*).

A severidade e a distribuição das alterações degenerativas são mais marcadas em casos com um prolongado período de incubação e sinais clínicos pronunciados. A raça do ovino afetado também tem uma relação com os achados neuropatológicos. Ovinos da raça Cheviot apresentam menos vacuolização neuronal que outras raças (SUMMERS *et al.*, 1995).

A vacuolização neuronal e da neurópila são, portanto, características de Scrapie e a distribuição das lesões no encéfalo pode variar de acordo com a cepa do prion e do genótipo do ovino (HUNTER, 2003; GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005). Segundo WELLS e WELLS (1989) e GAVIER-WIDÉN *et al.* (2001) vacuolização na substância cinzenta, e algumas vezes também na substância branca, ocorre nas encefalopatias transmissíveis, tanto natural quanto experimental. Vacuolização similar ocorre também em infecções com alguns vírus convencionais. Adicionalmente, causas fisiológicas, doenças hereditárias, metabólicas, tóxicas e infecciosas e múltiplos artefatos processuais podem cursar com vacuolização neuronal e na neurópila (GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2001).

No pericário neuronal ocorreram vacúolos de dimensões diversas, solitários ou múltiplos (Figura 2), poucos deles distendendo o pericário e produzindo neurônios balonosos com apenas uma fina margem de citoplasma. Estes vacúolos estavam basicamente vazios, exceto por um material eosinofílico levemente fibrilar ou finamente vacuolar; algumas vezes continham corpúsculos globulares, levemente eosinofílicos (Figura 3). Depósitos filamentosos observados em ovinos normais

foram relatados anteriormente, porém sua natureza exata não pôde ser determinada (RYDER *et al.*, 2001).

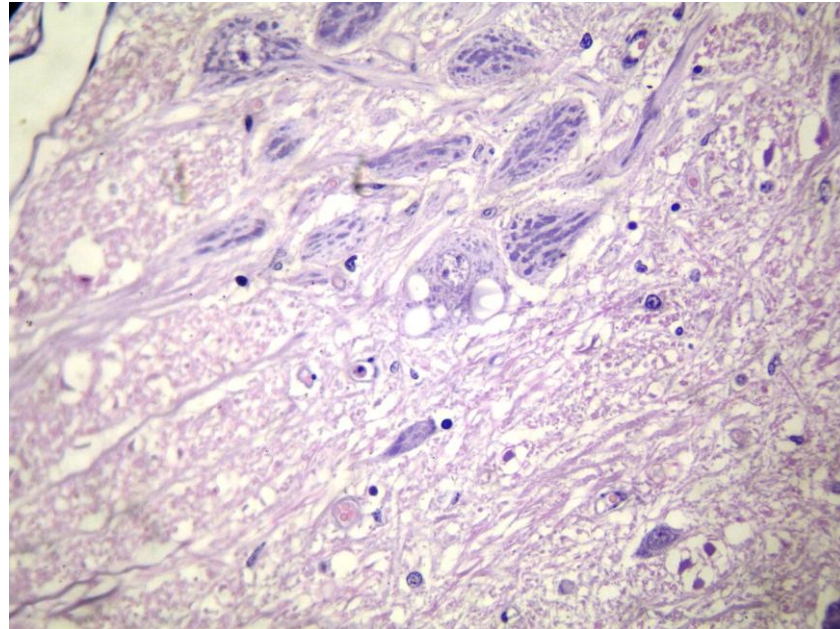


Figura 2 – Ovino, Scrapie, neurônio com múltiplos vacúolos no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x

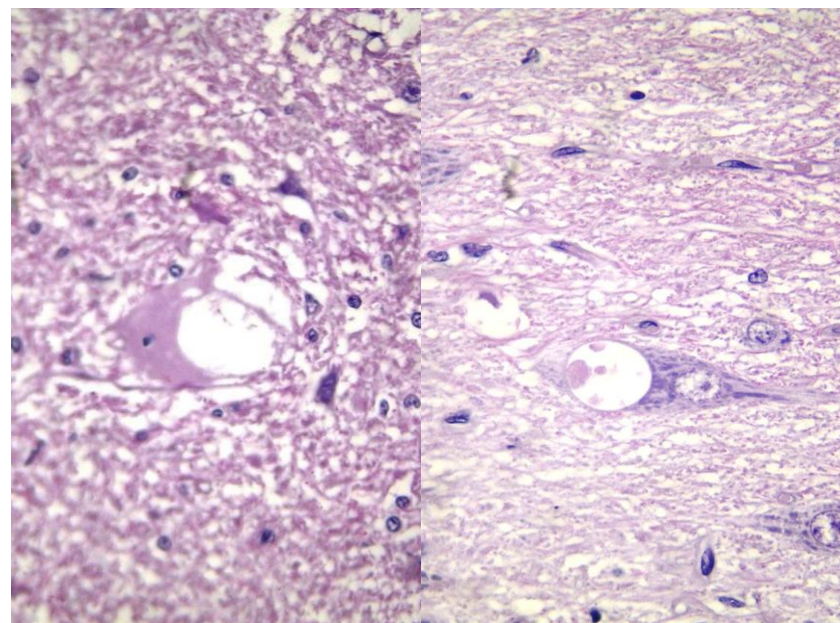


Figura 3 – Ovino, Scrapie, vacúolos grandes e duplos no pericário neuronal contendo material eosinofílico levemente fibrilar ou corpúsculos globulares, coloração de HE, aumento 40x

A alteração espongiiforme (Figura 4) foi acompanhada de modestas hipertrofia e hiperplasia astrocitária (astrocitose) e um acúmulo muito ocasional de células mononucleares também foi observado. A gliose e astrocitose podem ser indicadores não específicos, porém indicam dano encefálico precoce. Estas alterações foram detectadas em várias áreas encefálicas acompanhando microcavitação em casos de Scrapie (THACKRAY *et al.*, 2002).

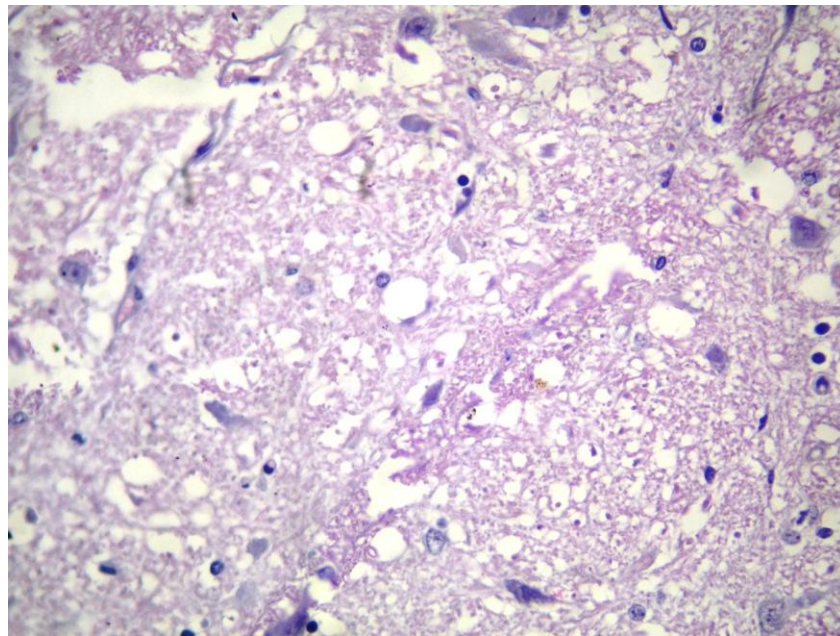


Figura 4 – Ovino, Scrapie, vacuolização da neurópila, coloração de HE, aumento 40x

Além da alteração característica de vacuolização, ocorreram outras formas de degeneração e necrose neuronal, como hipercromasia e picnose, e cromatólise. Um achado adicional, que ocorreu particularmente nos córtex cerebral e cerebelar, não associado com a alteração espongiiforme, foi a deposição cerebrovascular de amilóide. Esse material foi positivo para a coloração de Vermelho Congo, demonstrando uma coloração opaca levemente avermelhada. De acordo com Van KEULEN *et al.* (1995) deposição de amilóide foi encontrada nas meninges e encéfalo e quando coradas com Vermelho Congo e examinadas com luz polarizada, apresentavam birrefringência. Adicionalmente depósitos de amilóide foram descritos nas paredes dos vasos sanguíneos (incluindo capilares) tanto no encéfalo quanto nas leptomeninges. Em secções de imuno-histoquímica a deposição de amilóide mostrou-se intensamente corada para PrP^{Sc}. Já DETWILER (1999) afirma que a

observação de placas de amilóide em casos de Scrapie natural é uma ocorrência incomum. A avaliação da intensidade de deposição de amilóide no cérebro dos ovinos estudados não foi realizada.

Embora a descrição de vacúolos no sistema nervoso central em casos de Scrapie seja bem conhecida (SUMMERS *et al.*, 1995; KOVACS e BUDKA, 2008; OIE, 2000), a determinação do tamanho dos vacúolos e sua definição/nitidez é pouco descrita na literatura (KOVACS e BUDKA, 2008). Da mesma forma não há estudos comparando estes aspectos histológicos com a positividade dos casos de imunohistoquímica.

Os vacúolos presentes no pericário neuronal foram classificados em categorias, considerando-se sua dimensão e sua delimitação. As categorias compreendiam, quanto à dimensão, vacúolos pequenos (com 7 a 10 μm de diâmetro) (Figuras 5 e 6), médios (10 a 30 μm de diâmetro) (Figura 7) e grandes (com 30 a 40 μm de diâmetro) (Figuras 8 e 9); quanto à delimitação classificaram-se em: vacúolos com bordos bem definidos e vacúolos com bordos pouco definidos.

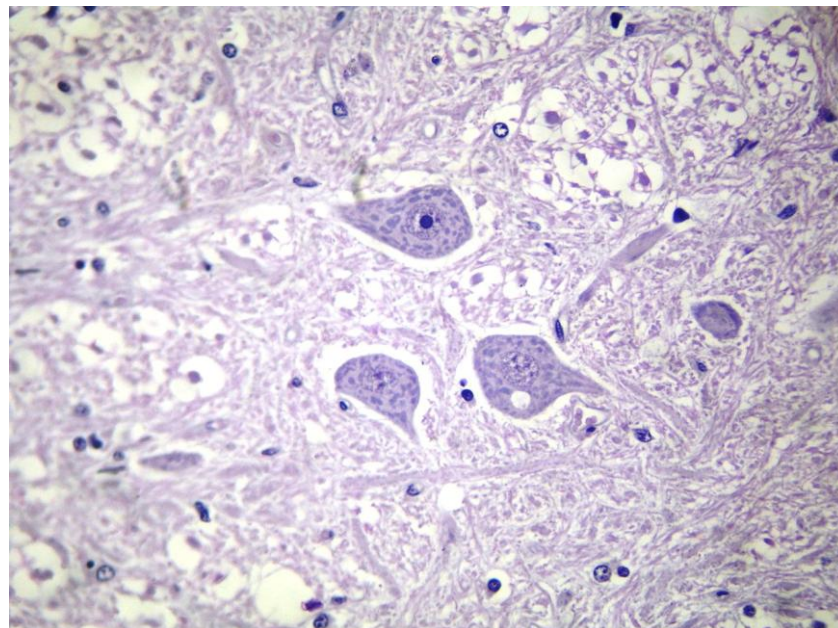


Figura 5 – Ovino, Scrapie, vacúolo pequeno no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x.

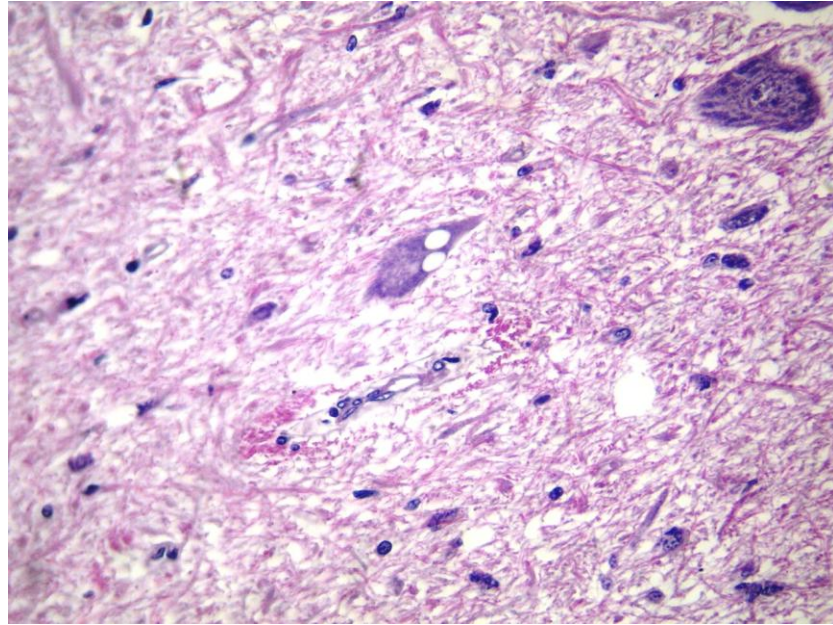


Figura 6 – Ovino, Scrapie, vacúolos pequenos e duplos no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x

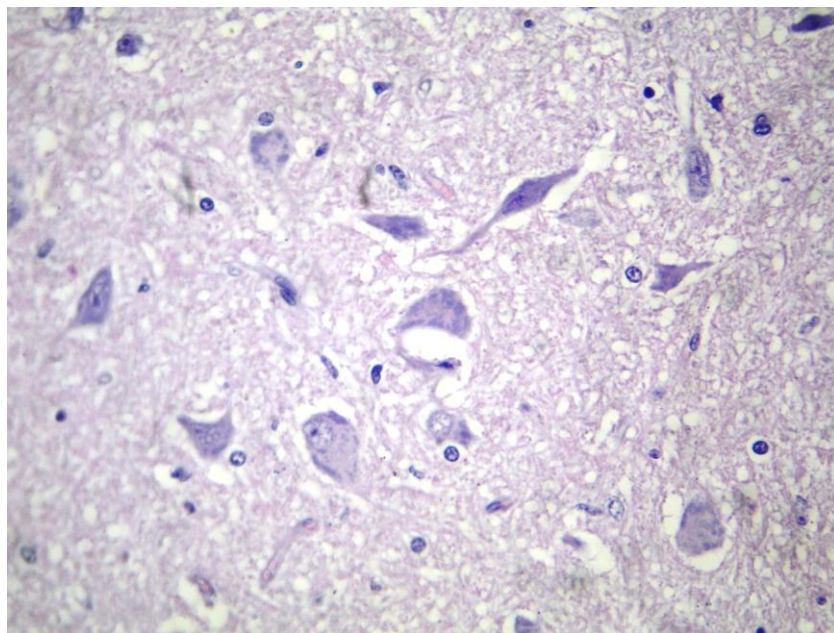


Figura 7 – Ovino, Scrapie, vacúolo médio no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x.

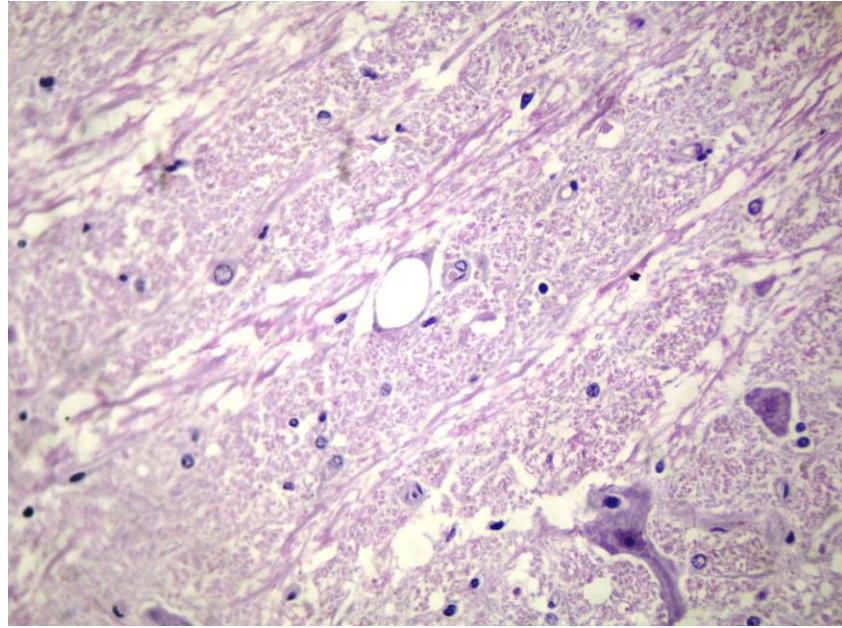


Figura 8 – Ovino, Scrapie, vacúolo grande no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x

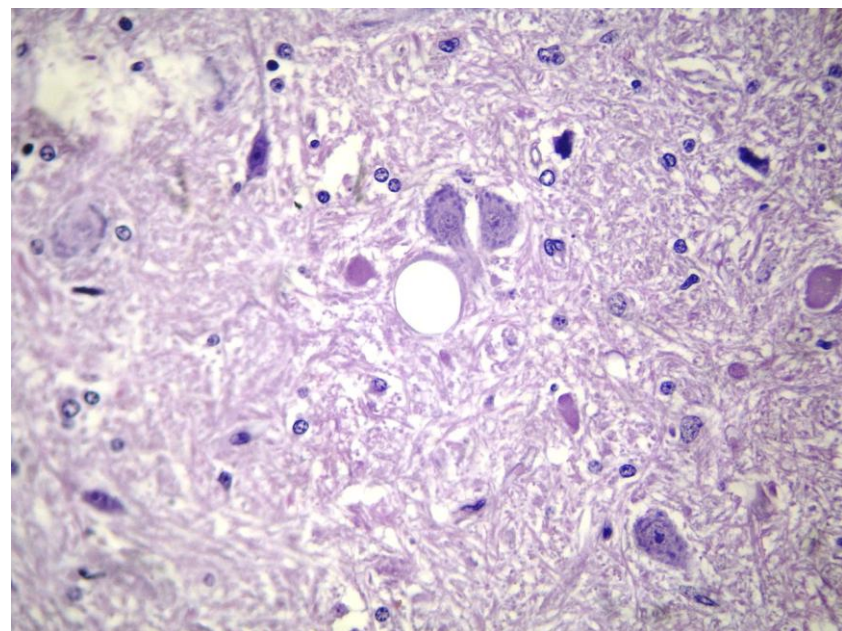


Figura 9 – Ovino, Scrapie, vacúolo grande no pericário neuronal, coloração de HE, aumento 40x

Na avaliação histológica das 118 amostras processadas para exame histológico, 50 amostras (42,38%) apresentaram vacuolização no pericário neuronal, sendo que em 29 (58%) a vacuolização ocorreu em apenas um dos cortes

histológicos de rotina examinados, e em 21 (42%) a vacuolização foi observada em mais de um corte histológico.

A distribuição da vacuolização nos diferentes cortes examinados é apresentada no **Quadro 2**.

Quadro 2 – Distribuição dos vacúolos nos cortes histológicos de rotina.

CORTES HISTOLÓGICOS	OCORRÊNCIA (Nº AMOSTRAS)	FREQUÊNCIA (%)
Óbex	14	28
Pedúnculo	7	14
Colículo caudal	6	12
Colículo rostral	2	4
Óbex e pedúnculo	6	12
Óbex e colículo caudal	2	4
Óbex e colículo rostral	1	2
Óbex, pedúnculo e colículo caudal	1	2
Óbex, pedúnculo e colículo rostral	1	2
Óbex, colículo caudal e colículo rostral	2	4
Pedúnculo e colículo caudal	5	10
Pedúnculo e colículo rostral	3	6
TOTAL	50	100

Os resultados obtidos, em relação às categorias de classificação dos vacúolos quanto à dimensão e delimitação, são apresentados na **Tabela 1**.

As 118 amostras de encéfalo (óbex) e tecido linfóide foram colhidas e enviadas ao Laboratório de Referência em Diagnósticos de Doenças Priônicas, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para detecção de PrP^{Sc} pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ). O exame imuno-histoquímico é particularmente útil para o diagnóstico de Scrapie em ovinos, podendo ser aplicado em estágios clínicos iniciais da doença, quando alterações histológicas são leves, ou para o exame em tecidos autolisados (O'ROURKE *et al.*, 2000).

Tabela 1 – Classificação dos vacúolos conforme dimensão e delimitação.

Tipo \ Localização	Óbex	Pedúnculo	Colículo Caudal	Colículo Rostral	TOTAL
	Nº Freq				
Grande e definido	14 38,89%	13 36,11%	5 13,89%	4 11,11%	36 41,86%
Médio e definido	2 25,00%	3 37,50%	2 25,00%	1 12,50%	8 9,30%
Pequeno e definido	5 38,46%	3 23,08%	4 30,77%	1 7,69%	13 15,12%
Grande e indefinido	2 25,00%	3 37,50%	2 25,00%	1 12,50%	8 9,30%
Médio e indefinido	2 28,57%	3 42,86%	1 14,29%	1 14,29%	7 8,14%
Pequeno e indefinido	4 28,57%	1 7,14%	4 28,57%	5 35,71%	14 16,28%
TOTAL	29 33,72%	26 30,23%	18 20,93%	13 15,12%	86 100%

Os resultados obtidos nos exames histológicos de rotina, quando comparados aos exames obtidos pela técnica de imuno-histoquímica, são demonstrados na **Tabela 2**.

Apenas 15 amostras (17,44%) apresentaram resultado positivo para detecção de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ em um ou em ambos os cortes testados. Em 13 destas amostras (15,12%) o resultado positivo foi obtido nos cortes de tecido linfóide, sendo negativo o resultado constatado nos fragmentos de encéfalo (óbex) de todas elas. Em uma das amostras (1,16%) apenas o corte de encéfalo (óbex) apresentou resultado positivo, não tendo sido testado o corte de tecido linfóide. Da mesma forma, somente em uma das amostras (1,16%) o resultado positivo foi observado em ambos os cortes (óbex e tecido linfóide). Os resultados estão apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 2 – Comparação da técnica de imuno-histoquímica com a presença de vacúolos neuronais.

Histologia de rotina IHQ		Com vacúolos	Sem vacúolos	TOTAL
		Nº Freq		
Positivo	Óbex e/ou tecido linfóide	10 8,47%	5 4,24%	15 12,71%
Negativo, testado 2 cortes	Óbex e tecido linfóide	19 16,10%	20 16,95%	39 33,05%
Negativo testado 1 corte	Óbex ou tecido linfóide	10 8,47%	22 18,64%	32 27,12%
Não testados	Óbex e tecido linfóide	10 8,47%	22 18,64%	32 27,12%
TOTAL		49 41,53%	69 58,47%	118 100,00%

Tabela 3 – Detecção de vacúolos nos cortes histológicos de rotina, nas amostras positivas para IHQ.

Resultado do corte Histológico de rotina	Amostras positivas testadas nos cortes de IHQ		Freq
	Óbex	Tecido linfóide	
	Nº de amostras		
Sem vacúolos, testada nos dois cortes de IHQ	0	4	26,67%
Sem vacúolos, testada nos dois cortes de IHQ	1*	1*	6,67%
Com vacúolos, testada nos dois cortes de IHQ	0	9	60,00%
Com vacúolos, testada em apenas um dos cortes de IHQ.	1	NT	6,67%
TOTAL	2	13	100,00 %

NT – Não testada; * Presença de vacuolização em ambos os cortes submetidos à técnica de IHQ na mesma amostra.

Destas 15 amostras, 10 (66,67%) apresentaram vacuolização no pericário neuronal, sendo que em 7 delas (70%) a vacuolização ocorreu em apenas um dos cortes histológicos examinados e nas outras 3 (30%) a vacuolização foi observada em mais de um corte histológico. Os resultados são apresentados no **Quadro 3**.

Quadro 3 – Distribuição dos vacúolos nos cortes histológicos de rotina, nas amostras positivas para IHQ.

CORTES HISTOLÓGICOS	OCORRÊNCIA (Nº AMOSTRAS)	FREQUÊNCIA (%)
Óbex	2	20
Pedúnculo	2	20
Colículo caudal	3	30
Óbex e pedúnculo	2	20
Óbex, colículo caudal e colículo rostral	1	10
TOTAL	10	100

A classificação dos vacúolos observados nas lâminas histológicas de rotina das 15 amostras que resultaram positivas para a presença de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ, é demonstrada na **Tabela 4**. Acúmulo de PrP^{Sc} nos neurônios e nas células da glia é a característica de TSE, e pode ser detectado em estágios anteriores às alterações vacuolares (GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005). A doença clínica foi associada com o acúmulo da proteína priônica específica da doença no SNC, mas não com patologia vacuolar (RYDER *et al.*, 2009).

Uma grande proporção de casos de TSE em animais clinicamente saudáveis detectados durante a vigilância no abate, não apresentam alterações histopatológicas no encéfalo. Isto é decorrente ao fato de que a PrP^{Sc} pode ser detectada no encéfalo alguns meses antes do desenvolvimento de lesões e do início dos sinais clínicos da doença (GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005).

Tabela 4 – Classificação dos vacúolos conforme dimensão e delimitação, nas amostras positivas para IHQ.

Localização Tipo	Óbex	Pedúnculo	Colículo Caudal	Colículo Rostral	TOTAL
	Nº Freq				
Grande e definido	3 42,86%	2 28,57%	1 14,29%	1 14,29%	7 46,67%
Médio e definido	1 50,00%	1 50,00%	-	-	2 13,33%
Pequeno e definido	-	1 50,00%	1 50,00%	-	2 13,33%
Grande e indefinido	-	-	-	-	-
Médio e indefinido	1 100,00 %	-	-	-	1 6,67%
Pequeno e indefinido	-	-	3 100,00%	-	3 20,00%
TOTAL	5 33,33%	4 26,67%	5 33,33%	1 6,67%	15 100,00%

Trinta e nove amostras (45,35%) testadas para a presença de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ apresentaram resultados negativos nos dois cortes submetidos à técnica. Destas amostras, 20 (51,28%) não apresentaram vacuolização nos cortes histológicos de rotina e em 19 (48,72%) delas foram observados vacúolos nos cortes histológicos. Das 19 amostras que apresentaram vacuolização no pericário neuronal, em 12 (63,16%) delas a vacuolização ocorreu apenas em um dos cortes histológicos examinados, e nas outras 7 (36,84%) a vacuolização foi observada em mais de um corte histológico. A distribuição da vacuolização nos diferentes cortes examinados é apresentada no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Distribuição dos vacúolos nos cortes histológicos de rotina, nas amostras negativas para IHQ nos dois cortes examinados.

CORTES HISTOLÓGICOS	OCORRÊNCIA (Nº AMOSTRAS)	FREQUÊNCIA (%)
Óbex	5	26,32
Pedúnculo	3	15,79
Colículo caudal	2	10,53
Colículo rostral	2	10,53
Óbex e pedúnculo	1	5,26
Óbex, pedúnculo e colículo rostral	1	5,26
Pedúnculo e colículo caudal	3	15,79
Pedúnculo e colículo rostral	2	10,53
TOTAL	19	100,00

A classificação dos vacúolos observados nas lâminas histológicas de rotina, das 19 amostras que resultaram negativas para a presença de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ está demonstrada na **Tabela 5**.

Trinta e duas amostras foram testadas pela técnica de imuno-histoquímica em apenas um dos cortes, sendo 27 amostras (84,37%) testadas somente no corte do encéfalo (óbex) e 5 (15,63%) amostras testadas apenas no corte de tecido linfóide. Todas as 32 amostras resultaram negativas para a presença de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ. Destas amostras, 22 (68,75%) não apresentaram vacuolização nos cortes histológicos de rotina e em 10 (31,25%) delas foram observados vacúolos nos cortes histológicos, conforme demonstrado na **Tabela 6**.

Dez amostras apresentaram vacuolização no pericário neuronal, sendo que em 5 delas (50%) a vacuolização ocorreu em apenas um dos cortes histológicos examinados, e nas outras 5 (50%) a vacuolização foi observada em mais de um corte histológico.

A distribuição da vacuolização nos diferentes cortes examinados é apresentada no **Quadro 5**.

Tabela 5 – Classificação dos vacúolos conforme dimensão e delimitação, nas amostras negativas para IHQ, testadas nos dois cortes examinados.

Tipo \ Localização	Óbex	Pedúnculo	Colículo Caudal	Colículo Rostral	TOTAL
	Nº Freq				
Grande e definido	2 20,00%	5 50,00%	1 10,00%	2 20,00%	10 33,33%
Médio e definido	-	1 33,33%	1 33,33%	1 33,33%	3 10,00%
Pequeno e definido	2 33,33%	2 33,33%	1 16,67%	1 16,67%	6 20,00%
Grande e indefinido	-	2 50,00%	2 50,00%	-	4 13,33%
Médio e indefinido	1 33,33%	2 66,67%	-	-	3 10,00%
Pequeno e indefinido	2 50,00%	-	1 25,00%	1 25,00%	4 13,33%
TOTAL	7 23,33%	12 40,00%	6 20,00%	5 16,67%	30 100,00%

Tabela 6 – Detecção de vacúolos nos cortes histológicos de rotina, nas amostras negativas para IHQ, testadas em apenas um dos cortes.

Amostras negativas testadas apenas em um dos cortes de IHQ	Corte histológico testado		TOTAL
	Óbex	Tecido linfóide	
	Nº Freq		
Sem vacúolos nos cortes de rotina do encéfalo	18 81,82%	4 18,18%	22 68,75%
Com vacúolos nos cortes de rotina do encéfalo	9 90,00%	1 10,00%	10 31,25%
TOTAL	27 84,37%	5 15,63%	32 100%

Quadro 5 – Distribuição dos vacúolos nos cortes histológicos de rotina, nas amostras negativas para IHQ, testadas em apenas um dos cortes.

CORTES HISTOLÓGICOS	OCORRÊNCIA (Nº AMOSTRAS)	FREQUÊNCIA (%)
Óbex	3	30
Pedúnculo	1	10
Colículo caudal	1	10
Óbex e pedúnculo	2	20
Óbex e colículo caudal	1	10
Pedúnculo e colículo caudal	1	10
Pedúnculo e colículo rostral	1	10
TOTAL	10	100

A classificação dos vacúolos observados nas lâminas histológicas de rotina, das 32 amostras que resultaram negativas para a presença de PrP^{Sc} pela técnica de IHQ está demonstrada na **Tabela 7**.

Das 118 amostras de encéfalo (óbex) e tecido linfóide colhidas, 32 (27,12%) não foram testadas pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ), nem no encéfalo nem nos tecidos linfóides. Vinte e duas destas amostras (68,75%) não apresentaram vacuolização e 10 (31,25%) delas exibiram vacuolização nos cortes histológicos de rotina, sendo 4 amostras (40%) em apenas um dos cortes, e em 6 amostras (60%) localizados em mais de um corte, conforme apresentado no **Quadro 6**.

A classificação das vacuolizações observadas nas lâminas histológicas de rotina, das amostras que não foram testadas pela técnica de imuno-histoquímica, está demonstrada na **Tabela 8**.

Tabela 7 – Classificação dos vacúolos conforme dimensão e delimitação, nas amostras negativas para IHQ, testadas em apenas um dos cortes.

Tipo \ Localização	Óbex	Pedúnculo	Colículo Caudal	Colículo Rostral	TOTAL
	Nº Freq				
Grande e definido	5 50,00%	4 40,00%	1 10,00%	-	10 62,50%
Médio e definido	-	-	-	-	-
Pequeno e definido	-	-	1 100,00%	-	1 6,25%
Grande e indefinido	2 100,00%	-	-	-	2 12,50%
Médio e indefinido	-	1 50,00%	-	1 50,00%	2 12,50%
Pequeno e indefinido	-	1 100,00%	-	-	1 6,25%
TOTAL	7 43,75%	6 37,50%	2 12,50%	1 6,25%	16 100,00%

Quadro 6 – Distribuição dos vacúolos nos cortes histológicos de rotina, para as amostras não testadas por IHQ.

CORTES HISTOLÓGICOS	OCORRÊNCIA (Nº AMOSTRAS)	FREQUÊNCIA (%)
Óbex	3	30
Pedúnculo	1	10
Óbex e pedúnculo	1	10
Óbex e colículo caudal	1	10
Óbex e colículo rostral	1	10
Óbex, pedúnculo e colículo caudal	1	10
Óbex, colículo caudal e colículo rostral	1	10
Pedúnculo e colículo caudal	1	10
TOTAL	10	100

Tabela 8 – Classificação dos vacúolos conforme dimensão e delimitação, para as amostras não testadas por IHQ.

Tipo \ Localização	Óbex	Pedúnculo	Colículo Caudal	Colículo Rostral	TOTAL
	Nº Freq				
Grande e definido	3 42,86%	2 28,56%	1 14,29%	1 14,29%	7 29,17%
Médio e definido	1 33,33%	1 33,33%	1 33,33%	-	3 12,50%
Pequeno e definido	3 60,00%	1 20,00%	1 20,00%	-	5 20,83%
Grande e indefinido	-	-	-	1 100,00%	1 4,17%
Médio e indefinido	-	-	1 100,00%	-	1 4,17%
Pequeno e indefinido	2 28,56%	1 14,29%	-	4 57,14%	7 29,17%
TOTAL	9 37,50%	5 20,83%	4 16,67%	6 25,00%	24 100,00%

Tem sido reconhecido que ovinos com sinais clínicos clássicos de Scrapie nem sempre apresentam lesões histológicas diagnósticas (MILLER *et al.*, 1993). Segundo OIE (2009) e DETWILER (1999) deve-se ter cautela na interpretação isolada da histopatologia, uma vez que vacuolização incidental de neurônios pode estar presente em encéfalos de ovinos aparentemente saudáveis, ainda que em baixa frequência. Não existe correlação direta entre a severidade dos sinais clínicos e as alterações patológicas. Um diagnóstico clínico suspeito de Scrapie não pode ser refutado pelo insucesso em se encontrar alterações vacuolares significativas no encéfalo. A ausência de lesões não é, portanto, evidência de ausência de infecção, uma vez que o Scrapie pode ocorrer mesmo sem sinais clínicos ou alterações morfológicas detectáveis.

Portanto, a precisão do diagnóstico desta doença deve ser aumentada pelo uso de técnicas complementares para a detecção de PrP^{Sc}, (MILLER, 1993) como realizado por imuno-histoquímica nestes casos. MILLER (1993) descreve que a detecção de PrP^{Sc} por IHC em 4 de 11 ovinos sem alterações histológicas para Scrapie sugere que este método pode ser capaz de identificar ovinos com a doença pré-clínica ou ovinos que desenvolvem sinais clínicos sem lesões histológicas características concomitantes.

Segundo Van KEULEN *et al.* (1995), FOSTER *et al.* (1996) e RYDER *et al.* (2001) embora a imunomarcagem para PrP^{Sc} e a vacuolização geralmente ocorram juntas em áreas como o núcleo dorsal do vago, cerebelo e núcleo talâmico, não existe uma relação entre a vacuolização e a imunorreatividade da PrP^{Sc}, tanto nas formas de doença natural como experimental. PrP^{Sc} pôde ser observada sem evidência de vacuolização e, em contraste, vacuolização foi raramente aparente sem algum nível de coloração de PrP^{Sc} na adjacência imediata. Da mesma forma, nos ovinos avaliados neste estudo, não se observou uma relação direta e integral entre vacuolização no sistema nervoso central e positividade para PrP^{Sc} na imuno-histoquímica, conforme dados apresentados na Tabela 2.

Testes aplicados a infecções em estágio inicial, onde o acúmulo de PrP^{Sc} é mínimo ou apenas no limite de detecção do teste pode levar a resultados falso-negativos ou inconclusivos (GAVIER-WIDÉN *et al.*, 2005).

Animais incubando a doença ou mesmo aqueles animais que nunca desenvolvem sinais clínicos podem ainda ser uma fonte de infecção para outros. A doença clínica somente se desenvolve se a infecção alcançar o SNC (OIE, 2000).

A detecção de PrP^{Sc} nos tecidos linforreticulares durante o período de incubação do Scrapie em alguns animais oferece um método de diagnóstico preclínico do Scrapie e pode ser particularmente útil para fins de vigilância, podendo ser detectado *in vivo*, por meio de biopsia. A concordância entre os resultados de múltiplas abordagens diagnósticas proporciona maior segurança de precisão (acuracidade). Certamente, em situações de vigilância onde o monitoramento visa obtenção de evidências de ausência de Scrapie em pequenos ruminantes, pode ser necessário aplicar múltiplos critérios diagnósticos (histopatologia e imuno-histoquímica ou *immunoblotting*) ou testar, pelo menos, duas secções do encéfalo (tronco encefálico e cerebelo) para manter um alto grau de segurança nos resultados negativos. Entretanto, não é apropriado para casos atípicos, ou uma

proporção de casos clássicos, podendo ser usado para confirmar a presença de infecção e não para provar a ausência da doença (OIE, 2009).

Portanto, na imposição de algum tipo de bioensaio prévio ao abate testando ovinos, embora um resultado positivo seja confiável, um resultado negativo não irá fornecer a total segurança requerida para que o produto de origem animal (ovina) entre na cadeia alimentar humana. O exame *postmortem* do encéfalo permanece, até o momento, a única possibilidade segura (HUNTER, 2003).

5 CONCLUSÕES

1. As alterações histológicas observadas no sistema nervoso central dos ovinos neste estudo condizem com as alterações típicas de Scrapie descritas na literatura.
2. A aplicação da técnica de imuno-histoquímica se revelou eficiente para o diagnóstico de Scrapie, no entanto não houve uma relação direta e integral entre casos de vacuolização cerebral e imunopositividade para PrP^{Sc}.
3. Embora um resultado positivo na avaliação imuno-histoquímica seja confiável, um resultado negativo não é garantia de ausência da doença.

REFERÊNCIAS

ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; KEULEN, L. van; SCHELCHER, F.; ELSESEN, J.M.; LANTIER, F. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 3115-3126, 2000.

ANDRÉOLETTI, O.; LACROUX, C.; CHABERT, A.; MONNREAU, L.; TABOURET, G.; LANTIER, F.; BERTHON, P.; EYCHENNE, F.; BENESTAD, S.L.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*, v. 83, p. 2607-2616, 2002.

ANDRÉOLETTI, O.; TABOURET, G.; LACROUX, C.; FOUCRAS, G.; CHABERT, A.; LUGAN, S.; ROUILLON, V.; EYCHENNE, F.; ELSESEN, J.M.; SCHELCHER, F. The pathogenesis of scrapie in small ruminants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 41.

BASLER, K.; OESAH, B.; SCOTT, M.; WESTAWAY, D.; WALCHLI, M.; GROTH, D.F.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.; WEISSMANN, C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, v. 46, n. 3, p. 417-28, 1986.

BAYLIS, M. The epidemiology of scrapie and options for control. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 34.

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 the onset of clinical disease after oral challenge. *Veterinary Record*, v. 156, v. 7, p. 197-202, 2005.

BENESTAD, S.L.; SARRADIN, P.; THU, B.; SCHÖNHEIT, 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, p. 202-208, 2003.

BENESTAD, S.L.; ANDRÉOLETTI, O.; LAUDE, H.; GRASSI, J.; BILHEUDE, J.M.; SARRADIN, P.; MOUM, T.; MOLDAL, T.; BRATBERG, B. Atypical scrapie in Norway. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 55.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, v. 218, p. 1309-1311, 1982.

BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.G.; ZIEGLER, U.; BENCSIK, A.; MADEC, J.Y.; ERHARDT, G.; LUHKEN, G.; BARON, T.; GROSCHUP, 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.

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

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

DeBOSSCHERE, H.; ROELS, S.; BENESTAD, S.L.; VANOPDENBOSCH, E. Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record*, v. 155, n. 22, p. 707-708, 2004.

DETWILLER, L.A. Review on the current diagnosis of scrapie. Factores de riesgo para las encefalopatías espongiiformes transmisibles en ovinos y caprinos en la República Argentina. Argentine Scientific Advisory Committee on Bovine Spongiform Encephalopathy, 3rd meeting. August 9-11, 1999.

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

DICKINSON, A.G. Scrapie in sheep and goats. In: Kinberlin, R.H. (ed), *Slow virus diseases of animals and man*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, p. 209-241, 1976.

DRIEMEIER, D. Scrapie. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. São Paulo: Livraria Varela, 2001, vol. 1, p. 391-396.

ELOIT, M.; ADJOU, K.; CUOLPIER, M.; FONTAINE, J.J.; HAMEL, R.; LILIN, T.; MESSIAEN, S.; ANDREOLETTI, O.; BARON, T.; BENCSIK, A.; BIACABE, A.G.; BERINGUE, V.; LAUDE, H.; LE DUR, A.; VILOTTE, J.L.; COMOY, E.; DESLYS, J.P.; GRASSI, J.; SIMON, S.; LANTIER, F.; SARRADIN, P. BSE agent signatures in a goat. *Veterinary Record*, v. 156, p. 523-524, 2005.

EPSTEIN, V.; POINTING, S.; HALFACRE, S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Veterinary Record*, v. 157, n. 21, p. 667-668, 2005.

ERSDAL, C.; ULVUND, M.J.; BENESTAD, S.L.; TRANULIS, M.A. Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 164-174, 2003.

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

ESPENES, A.; PRESS, C.McL.; LANDSVERK, T.; TRANULIS, M.A.; ALEKSANDERSEN, M.; GUNNES, G.; BENESTAD, S.L.; FUGLESTVEIT, R.; ULVUND, M.J. Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, v. 134, p. 115-125, 2006.

ESPINOSA, J.C.; DÍAZ-SAN SEGUNDO, F.; PARRA, B.; RODRÍGUEZ-BENITO, J. A.; HERVA, M. E.; RELAÑO-GINÉS, A.; BRUN, A.; CANO, M. J.; MORALES, M.; TORRES, J.M. Scrapie: susceptibilidad/resistencia a la enfermedad. *Mundo Ganadero*, v. 169, 2004.

EU. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 laying down rules for the prevention, control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies. **Official Journal of the European Union**, v.147, p. 1-40, 2001.

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

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

GAVIER-WIDEN, D.; WELLS, G.A.H.; SIMMONS, M.M.; WILESMITHS, J.W.W.; RYAN, J. Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 124, p. 52-59, 2001.

GAVIER-WIDEN, D.; NOREMARK, M.; BENESTAD, S.; SIMMONS, M.; RENSTROM, L.; BRATBERG, B.; ELVANDER, M.; SEGERSTAD, C.H. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 16, n. 6, p. 562-567, 2004.

GAVIER-WIDÉN, 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, p. 509–527, 2005.

GEORGSSON, G.; SIGURDARSON, S.; BROWN, P. Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3737 – 3740, 2006.

GONZÁLEZ, L. Preclinical diagnosis of scrapie by rectal biopsy: towards live animal surveillance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 43.

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

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

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

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

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

HUNTER, N. Scrapie and experimental BSE in sheep. *British Medical Bulletin*, v. 66, p. 171-183, 2003.

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

JEFFREY, M.; MARTIN, S.; GONZÁLEZ, L.; RYDER, S.J.; BELLWORTHY, S.J.; JACKMAN, R. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *Journal of Comparative Pathology*, v. 125, n. 4, p. 271-284, 2001.

JOHNSON, C.J.; PHILLIPS, K.E.; SCHRAMM, P.T.; MCKENZIE, D.; AIKEN, J.M.; PEDERSEN, J.A. Prions adhere to soil minerals and remain infectious. *PLoS Pathogens*, v. 2, n. 4, e32, 2006.

KARIV-INBAL, Z.; BEN-HUR, T.; GRIGORIADIS, N.C.; ENGELSTEIN, R.; GABIZON, R. Urine from scrapie-infected hamsters comprises low levels of prion infectivity. *Neurodegenerative Diseases*, v. 3, p. 123-128, 2006.

KOVACS, G.G.; BUDKA, H. Prion diseases: from prion to cell pathology. *The American Journal of Pathology*, v. 172, p. 555-565, 2008.

LAMPERT, P.W.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J.JR. Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. *American Journal of Pathology*, v. 68, n. 3, p. 626-652, 1972.

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*, n 8, p. 1022 – 1037, 1998.

LEITA, L.; FORNASIER, F.; NOBILI, M. de; BERTOLI, A.; GENOVESI, S.; SEQUI, P. Interactions of prion proteins with soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 7, p. 1638-1644, 2006.

Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th edition. 2000. http://www.oie.int/eng/normes/mannual/A_00119.htm

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, p. 231-235, 2005.

NÖREMARK, M. Atypical scrapie in Europe – an epidemiologist’s view. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts... London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 56.

OIE Terrestrial Manual. 2009. Scrapie
<http://www.oie.int>

O’ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; PARISH, S.M.; KNOWLES, D.P. Preclinical detection of PrP^{Sc} in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *Veterinary Record*, v. 142, p. 489-491, 1998a.

O’ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; MILLER, J.M.; SPRAKER, T.R.; RIGGLEMAN, I.S.; 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, 1998b.

O’ROURKE, K.I.; BASZLER, T.V.; BESSER, T.E.; MILLER, J.M.; CUTLIP, R.C.; WELLS, G.A.H.; RYDER, S.J.; PARISH, S.M.; HAMIR, A.N.; COCKETT, N.E.; JENNY, A.; KNOWLES, D.P. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3254-3259, 2000.

ONNASCH, H.; GUNN, H.M.; BRADSHAW, B.J.; BENESTAD, S.L.; BASSETT, H.F. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record*, v 155, n. 20, p. 636-637, 2004.

ORGE, L.; GALO, A.; MACHADO, C.; LIMA, C.; OCHOA, C.; SILVA, J.; RAMOS, M.; SIMAS, J.P. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology*, v. 85, n. 11, p. 3487-3491, 2004.

PARAMITHIOTIS, E.; PINARD, M.; LAWTON, T.; LABOISSIERE, S.; LEATHERS, V.L.; ZOU, W-Q.; ESTEY, L.A.; LAMONTAGNE, J.; LEHTO, M.T.; KONDEJEWSKI, L.H.; FRANCOEUR, G.P.; PAPADOPOULOS, M.; HAGHIGHAT, A.; SPATZ, S.J.

HEAD, M.; WILL, R.; IRONSIDE, J.; O'ROURKE, K.; TONELLI, Q.; LEDEBUR, H.C.; CHAKRABARTTY, A.; CASHMAN, N.R. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nature Medicine*, v. 9, n. 7, p. 893-899, 2003.

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

PRUSINER, S.B. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 13363-13383, Nobel Lecture, 1998.

PRUSINER, S.B. An introduction to prion biology and diseases. In: _____. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 1 – 87.

PRUSINER, S.B.; WILLIAMS, E.; LAPLANCHE, J.L; SHINAGAWA, M. Scrapie, Chronic Wasting Disease, and Transmissible Mink Encephalopathy. In: PRUSINER, S.B. (Ed.). *Prion Biology and Diseases*. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, p. 545 – 594.

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

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

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

RYDER, S.J.; DEXTER, G.E.; HEASMAN, L.; WARNER, R.; MOORE, S.J. Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Veterinary Research*, v. 5, n. 9, p. 1-12, 2009.

SAUNDERS, G.C.; CAWTHRAW, S.; MOUNTJOY, S.J.; HOPE, J.; WINDL, O. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *Journal of General Virology*, v. 87, p. 3141-3149, 2006.

STACK, M. Molecular characterization of scrapie isolates: an evaluation of discriminatory techniques. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 46.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; de LAHUNTA, A. *Veterinary Neuropathology*. Mosby, 1. ed., cap. 3, p 136-141, 1995.

THACKRAY, A.M.; KLEIN, M.A.; AGUZZI, A.; BUDJOSO, R. Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculums. *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.J. Modelling the spread of scrapie in a sheep flock: evidence for increased transmission during lambing seasons. *Archives of Virology*, v. 151, p. 735-751, 2006.

Van KEULEN, L.J.M.; SCHREUDER, B.E.C.; MELOEN, R.H.; POELEN Van Den BERG, M.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS, M.E.W.; LANGEVELD, J.P.M. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*, v. 32, p. 299-308, 1995.

WELLS, G.A.; SCOTT, A.C.; JOHNSON, C.T.; GUNNIG, R.F.; HANCOCK, R.D.; JEFFREY, M.; DAWSON, M. BRADLEY, R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record*, v.121, p. 419-20, 1987.

WELLS, G.A.H.; WELLS, M. Neuropil vacuolation in brain: a reproducible histological processing artifact. *Journal of Comparative Pathology*, v.101, p. 355-362, 1989.

WILL, R.G. The epidemiology of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. In: INTERNATIONAL CONFERENCE – PRION DISEASES OF DOMESTIC LIVESTOCK, 2006, London. Abstracts...London: Veterinary Laboratory Agency, 2006, p. 29.

ANEXOS

ANEXO 1 – PORTARIA Nº 516, DE 9 DE DEZEMBRO DE 1997, MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

GABINETE DO MINISTRO

PORTARIA Nº 516, DE 9 DE DEZEMBRO DE 1997

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no art. 71 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, aprovado pelo Decreto nº 24.548, de 03 de julho de 1934, e considerado a decisão da 65ª Assembléia Geral do Comitê Internacional do Escritório Internacional de Epizootias OIE que alterou o Capítulo 3.2.13 Encefalopatia espongiforme bovina, do Código Zoossanitário Internacional, resolve :

Art. 1º Declarar o Brasil livre da encefalopatia espongiforme bovina, de acordo com o que estabelece o art. 3.2.13.2 do Código Zoossanitário Internacional.

Art. 2º Incluir a encefalopatia espongiforme bovina e a paraplexia enzoótica dos ovinos (scrapie) na relação de doenças passíveis de aplicação de medidas de defesa sanitária animal constante do art. 61 do Regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal, aprovado pelo Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934.

Parágrafo único. A encefalopatia espongiforme bovina e a paraplexia enzoótica dos ovinos (scrapie) são doenças de notificação obrigatória e suas ocorrências ou suspeições devem ser imediatamente informadas à autoridade de defesa sanitária animal da jurisdição.

Art. 3º Determinar a aplicação a partir de 1º de janeiro de 1998 das recomendações para prevenção da encefalopatia espongiforme bovina e outras encefalopatias espongiformes transmissíveis dos animais, constantes do art. 3.2.13.1 do Código Zoossanitário Internacional, especialmente :

a) a identificação dos perigos potenciais de introdução da doença mediante análise de risco que inclua a importação de animais vivos e produtos e sub-produtos de origem animal ;

b) a incorporação da encefalopatia espongiforme bovina, da paraplexia enzoótica dos ovinos (scrapie) e outras doenças com sintomatologia nervosa de caráter progressivo no sistema de vigilância da raiva dos herbívoros domésticos, na forma a ser estabelecida em ato do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Nota:

Redação dada pelo(a) Instrução Normativa nº 5/2002/MAA

Redação(ões) anterior(es):

Redação original

c) a proibição do uso de qualquer fonte de proteína de ruminantes na alimentação dos mesmos, com exceção das proteínas lácteas.

Art. 4º Delegar competência à Secretaria de Defesa Agropecuária para baixar as instruções complementares necessárias à implementação do disposto nesta Portaria.

Art. 5º O ingresso no Brasil de animais e produtos e sub-produtos de origem animal originários de terceiros países fica condicionado à comprovação do atendimento às medidas de vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis e que são recomendadas no Capítulo 3.2.13 do Código Zoossanitário Internacional.

Art. 6º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

ARLINDO PORTO

(Of. 216/97)

D.O.U., 11/12/1997

ANEXO 2 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002,
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2002

O SECRETARIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 83, inciso IV, do Regimento Interno da Secretaria, aprovado pela Portaria Ministerial nº 574, de 8 de dezembro de 1998, o art. 4º, da Portaria Ministerial nº 516, de 9 de dezembro de 1997, tendo em vista o disposto na Instrução Normativa SDA nº 24, de 7 de junho de 2001, e o que consta do Processo nº 21000.000109/2002-97, resolve:

Art. 1º Para o Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis em ruminantes - EET, deverão ser observados os requisitos de qualidade que constituem o anexo desta Instrução Normativa.

Art. 2º O credenciamento a que se refere o artigo anterior estará limitado às necessidades do Departamento de Defesa Animal no que diz respeito a número e localização geográfica dos laboratórios.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

LUIZ CARLOS DE OLIVEIRA

ANEXO

REQUISITOS DE QUALIDADE PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS EM RUMINANTES - EET

1-Objetivos

Estabelecer os requisitos de qualidade no diagnóstico das encefalopatias espongiformes transmissíveis visando o credenciamento de laboratórios pelo Departamento de Defesa Animal - DDA.

2-Aplicação

2.1- A presente Norma aplica-se ao laboratório que disponha de médico veterinário com especialização em patologia veterinária.

2.2- O credenciamento a que se refere a presente Norma está vinculado diretamente ao Médico Veterinário patologista, que será nomeado responsável técnico pelo diagnóstico de EET, mediante avaliação pelo DDA.

3-Definições

3.1- Para efeito da presente Norma define-se:

3.1.1- ENCÉFALO: é a parte do sistema nervoso central, exceto a medula espinhal, incluindo mielencéfalo, metencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo e telencéfalo.

3.1.2- TRONCO ENCEFÁLICO: é a parte compreendida pelo mielencéfalo (bulbo) e metencéfalo (com exceção do cerebelo) e diencéfalo. É o que resta do encéfalo quando se exclui o telencéfalo e o cerebelo.

4-Amostras

4.1- Amostra a ser colhida: material encefálico devidamente coletado, conforme está estabelecido no manual de procedimentos específico, aprovado pelo DDA.

4.2- Amostra a ser testada: fragmentos do encéfalo juntamente com a rede admirável carotídea, o gânglio do nervo trigêmeo e a hipófise deverão ser fixados em formol a 10% e processados conforme descrito no ANEXO I.

5-Recebimento das Amostras

5.1- As amostras deverão estar acompanhadas de Formulário de Requisição, conforme modelo estabelecido no ANEXO II.

5.2 - Não deverão ser recebidas amostras congeladas para exame histológico.

5.3- As amostras serão registradas em livro próprio contendo as seguintes informações: nº do protocolo; remetente e endereço; responsável pelo recebimento; proprietário e endereço; espécie; sexo; idade; raça; data de encaminhamento; data de entrada; data de saída e resultado, conforme modelo indicado no ANEXO III.

6- Conservação e Estocagem

6.1- A amostra a ser analisada deverá ser conservada em formol a 10%, até a montagem dos blocos de parafina e a confecção das lâminas.

6.2- Os blocos de parafina e as preparações histológicas deverão ser arquivados por pelo menos sete anos.

7- Segurança biológica

7.1- Deverão ser respeitadas as normas de segurança biológica em todos os procedimentos realizados com o material do exame.

7.2- As amostras quando descartadas deverão ser incineradas.

8 - Métodos de Diagnóstico

8.1- O exame histológico é um dos indicados para o diagnóstico da encefalopatia espongiforme transmissível, conforme descrito no ANEXO I.

8.2- O DDA baixará os requisitos necessários ao credenciamento de laboratórios de diagnóstico de EET's, através de outras metodologias analíticas, conforme a necessidade.

8.3- Qualquer alteração na metodologia analítica deverá ser previamente aprovada pelo DDA.

8.4- Quando houver um caso suspeito, a amostra deverá ser encaminhada ao Laboratório de Referência das EET para análise.

9 - Resultados e Relatórios

9.1- O resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios, conforme modelo proposto pelo DDA e de acordo com o seguinte fluxograma:

9.1.1- Resultado NEGATIVO: Será encaminhado ao órgão requisitante e ao DDA;

9.1.2- O Resultado SUSPEITO ou DUVIDOSO deve ser imediata e obrigatoriamente comunicado ao DDA e ao Laboratório de Referência para o diagnóstico das EET no Brasil;

9.1.3- Todo laboratório credenciado deverá encaminhar ao DDA, até o décimo dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais, em formulários próprios.

10 - Do Laboratório

10.1- O laboratório deve possuir instalações e equipamentos aprovados para a realização do exame histológico.

10.1.1- Protocolo: sala destinada ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivo dos mesmos.

10.1.2- Sala de Exame: Local onde as amostras serão processadas. Deverá estar provido de bancada impermeável e resistente à desinfecção, fontes de eletricidade suficientes e adequadas ao perfeito funcionamento dos equipamentos, fonte de gás quando necessária, e paredes com superfície lavável.

10.1.3- Esterilização e lavagem: Deverá estar provido de fontes de eletricidade, tanques ou pias que permitam a esterilização e a lavagem de todo material utilizado na realização da análise.

10.2- As instalações devem atender às normas de segurança biológica.

10.3- O laboratório deve possuir instalações, equipamentos e fluxos operacionais, aprovados para realização de exame histológico.

10.4- O laboratório deve designar um responsável técnico, com experiência específica comprovada, que realizará os exames.

10.5- Os laudos laboratoriais e o relatório mensal, deverão ser obrigatoriamente, assinados pelo responsável técnico ou seu substituto.

11 - Do responsável técnico e substituto

Para efeito de credenciamento e monitoramento, o responsável técnico e seu eventual substituto, serão submetidos a auditorias técnicas com acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizadas por auditores designados pelo DDA.

ANEXO I

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO PARA DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS - EET

PROGRAMAÇÃO DE PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O material após clivado deverá ser processado rotineiramente para exame histológico. Isso poderá ser feito em processador de tecidos automático (histotécnico) regulado conforme as conveniências do laboratório, mas obedecendo, em geral, os tempos abaixo discriminados. Esse processamento poderá ser feito manualmente.

CUBAS	REAGENTES	TEMPO DE IMERSÃO
Copo becker 1	Álcool 95% (formol)	1:00 hora
Copo becker 2	Álcool 95%	1:00 hora
Copo becker 3	Álcool 95%	1:00 hora
Copo becker 4	Álcool absoluto	1:00 hora
Copo becker 5	Álcool absoluto	1:00 hora
Copo becker 6	Xilol	1:00 hora
Copo becker 7	Xilol	1:00 hora
Copo becker 8	Xilol	1:00 hora
Estufa 1	Parafina	1:30 horas
Estufa 2	Parafina	1:30 horas

Após o processamento descrito acima é feita a inclusão do material em parafina. O material nos blocos de parafina é cortado em 5 mm de espessura e corado pela técnica de hematoxilina e eosina, conforme descrito abaixo.

1-Xilol	5minutos
2-Xilol	5minutos
3-Álcool absoluto	2minutos
4-Álcool 95%	2minutos
5-Álcool 80%	2minutos
6-Álcool 70%	1 minuto
7-Água corrente	Lavar
8-Hematoxilina	20-40segundos
9-Água corrente	lavar
10-Água de amônia	.	imersão até azular
11-Água corrente	lavar
12-Eosina	1-2minutos
13-Álcool 70%	rapidamente
14-Álcool 80%	rapidamente
15-Álcool 90%	rapidamente
16-Álcool absoluto	.	5minutos
17-Álcool absoluto	.	5minutos
18-Xilol	5minutos
19-Xilol	5minutos

20-Montar as lâminas utilizando bálsamo do Canadá (ou Entelan) para fixar a lamínula.

ANEXO II

Formulário de requisição de exames

Material nº: Laboratório / nº do protocolo / ano__ Município: _____ UF: _____
Veterinário Remetente: _____ CRMV-UF nº: _____
Endereço: _____ Telefone: () _____
Email: _____ Fax: () _____

Para preenchimento exclusivo quando for bovino importado (IN nº 08, de 13/02/2001) Nome do animal: _____ Número do animal: _____ Com sintomatologia nervosa? Sim Não Para indenização? Sim Não

Proprietário: _____ Propriedade: _____
Endereço: _____ Município: _____ UF: _____
Email: _____ Telefone: () _____ Fax: () _____

Espécie: Bovina Ovina Caprina Raça: _____ Idade: ___ meses Haviam outras
--

espécies afetadas? Sim Não Categoria afetada: Macho Fêmea Número de animais: no rebanho () doentes () mortos () O animal morto já foi vacinado para: Raiva Clostridiose Outras _____ O animal consumia concentrado? Sim Não

Data do início do surto/doença: __/__/__ Duração do surto/doença: _____		
Tipos de sinais clínicos apresentados:		
Morte súbita	Agressividade	Paralisia flácida dos membros posteriores
Depressão	Opistótomos	Paralisia flácida dos membros anteriores
Ataxia	Torneio	Paralisia facial
Com paralisia, mas ainda alerta	Convulsões	Paralisia da língua
Cegueira	Dismetria	Ranger de dentes
Incoordenação	Tremores	
Tetania	Nistagmo	
Duração dos sinais clínicos (desde o início até a morte): _____ horas		
Haviam animais que se recuperaram dos sinais clínicos? Sim Não Que percentual? _____ %		

Dia e hora da morte: __/__/__ às _____: _____ Tempo decorrido entre a morte e a coleta do material: _____ horas Tempo decorrido entre a morte e a fixação do material: _____ horas minuto Material conservado em: _____

Veterinário responsável pela coleta: _____ CRMV-UF nº: _____
 Endereço: _____ Telefone: () _____
 Email: _____ Fax: () _____

Observações: _____

Local / Data: _____, __/__/__

ANEXO III

MODELO PARA LIVRO DE REGISTRO DE AMOSTRAS PARA O DIAGNÓSTICO DE EET EM RUMINANTES

Nº	Remetente/	Responsável	Proprietário/	Espécie	Sexo	Idade	Raça	Data de	Data	Data	Resul
		pelo						Encaminha			

protocolo	Endereço	recebimento	Endereço					mento	entrada	saída	

(Of. El. nº 20/2002)

D.O.U., 05/03/2002

ANEXO 3 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 27 DE FEVEREIRO DE 2004,
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 27 DE FEVEREIRO DE 2004

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhe conferem o inciso II, Art. 15, do Decreto nº 4.629, de 21 de março de 2003 e o art. 4º, da Portaria Ministerial nº 516, de 9 de dezembro de 1997, e tendo em vista o que consta do Processo nº 21000.012718/2003-70, resolve:

Art. 1º Estabelecer as normas sobre os requisitos de qualidade para efeito de credenciamento e monitoramento de laboratório pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com vistas a procederem a diagnósticos das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET) em ruminantes pela técnica de imunohistoquímica (IHQ), conforme disposto no Anexo I, bem como, aprovar os modelos de formulários para requisição e laudo de resultado de exames e registro de amostras, nas formas constantes dos anexos II a IV desta Instrução.

Parágrafo único. Para o credenciamento e monitoramento previstos no caput deste artigo serão observadas as normas sobre os requisitos de qualidade constantes do Anexo I desta Instrução Normativa e as da Instrução Normativa nº 51, de 27 de junho de 2003.

Art. 2º O laboratório a ser credenciado deverá dispor de Responsável Técnico (RT) com formação profissional de Médico Veterinário, experiência comprovada em patologia veterinária e domínio da técnica de IHQ.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

MAÇÃO TADANO ANEXO I

NORMAS SOBRE OS REQUISITOS DE QUALIDADE PARA O CREDENCIAMENTO E MONITORAMENTO DE LABORATÓRIOS DE DIAGNÓSTICO DAS ENCEFALO-PATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISSÍVEIS(EET) EM RUMINANTES, PELA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA(IHQ)

1. DAS DEFINIÇÕES

1.1 Bulbo: porção do tronco encefálico que inicia aproximadamente na altura da inserção do primeiro par de nervos cervicais e se estende rostralmente até o bordo caudal da ponte;

1.2 Óbex: marcação anatômica no tronco encefálico que consiste na junção das ténias do sexto ventrículo no ângulo posterior;

1.3 Cerebelo: porção do metencéfalo localizada caudalmente aos lobos occipitais do telencéfalo e sobre a ponte e o bulbo (medula oblonga), formando a maior parte do teto do quarto ventrículo;

1.4 Órgãos Linfóides: locais de produção de células linfóides, como timo, baço e linfonodos e, agregados linfóides: tonsilas, placas Peyer e terceira pálpebra; e

1.5 Protocolo: ambiente destinado ao recebimento das amostras, registro, expedição dos resultados e arquivo dos mesmos.

2. DAS AMOSTRAS

2.1 A amostra de eleição a ser testada é constituída por fragmento de tecido devidamente fixado em formol a 10% (dez por cento) de está discriminada conforme a espécie:

2.1.1 Bovina - bulbo na altura do óbex; e

2.2.2 Ovina e Caprina - bulbo na altura do óbex, cerebelo e órgãos linfóides.

3. DOS RECEBIMENTOS DAS AMOSTRAS

3.1 As amostras deverão estar acompanhadas de formulário de requisição de exame, devidamente preenchido, conforme modelo estabelecido no Anexo II; e

3.2 As amostras serão registradas em livro próprio conforme modelo estabelecido no Anexo III.

4. DA CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM

4.1 A amostra deve ser conservada em formol a 10% (dez por cento), até a inclusão em blocos de parafina e a confecção das lâminas; e

4.2 Os blocos de parafina e as preparações histológicas deverão ser arquivados por, pelo menos, sete anos.

5. DA SEGURANÇA BIOLÓGICA

5.1 O laboratório deverá seguir os procedimentos de biossegurança preconizados para doenças priônicas;

5.2 Na ocorrência de amostra positiva deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

5.2.1 O material utilizado para o diagnóstico, no dia, deverá ser submetido a um processo de desinfecção com Hidróxido de Sódio a 2N por duas horas e, após bem enxaguado, autoclavado a 134° C (cento e trinta e quatro graus celsius), por uma hora; e

5.2.2 O material a ser descartado deverá ser duplamente embalado em sacos adequados para lixos infecciosos e incinerado posteriormente.

6. DO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO

6.1 A técnica de IHQ descrita no item 10, deste anexo, é um dos métodos indicados para o diagnóstico das EET;

6.2 Os procedimentos no manejo de reativos utilizados na técnica de IHQ são os descritos no item 11 deste anexo; e

6.3 Qualquer alteração na metodologia analítica deverá ser previamente aprovada pelo MAPA.

7. DOS RESULTADOS E RELATÓRIOS

7.1 Os laudos de resultados dos exames deverão ser emitidos em formulários próprios conforme modelo constante do Anexo IV, de acordo com o seguinte fluxo:

7.1.1 O resultado negativo será encaminhado ao requisitante e ao setor competente do MAPA;

7.1.2 O resultado suspeito ou duvidoso será encaminhado ao requisitante, ao setor competente do MAPA e ao laboratório de referência para o diagnóstico das EET no Brasil; e

7.1.3 Todo laboratório credenciado deverá encaminhar ao setor competente do MAPA, até o décimo dia útil do mês subsequente, relatório das atividades mensais, elaborado em sistema específico.

8. DAS INSTALAÇÕES E EQUIPAMENTOS DO LABORATÓRIO

8.1 O laboratório deve possuir instalações e equipamentos adequados para a realização do exame de IHQ;

8.2 As instalações devem obedecer a um fluxo operacional coerente com a técnica desenvolvida;

8.3 O local de exame deve estar provido de bancada impermeável e resistente à desinfecção, fontes de eletricidade suficientes e adequadas ao perfeito funcionamento dos equipamentos e paredes com superfície lavável; e

8.4 O setor de esterilização e lavagem deve estar provido de fontes de eletricidade, tanques ou pias que permitam a higienização de todo material utilizado na realização da análise.

8.5 O laboratório deve estar equipado com:

8.5.1 Arquivo;

8.5.2 Microcomputador;

8.5.3 Caixas para arquivo das lâminas e blocos de tecidos;

8.5.4 Micrótomo;

8.5.6 Processador automático de tecidos (opcional);

8.5.7 Autoincluser de parafina (opcional);

8.5.8 Banho Maria histológico;

8.5.9 Refrigerador/ freezer -20°C (vinte graus celsius negativos);

8.5.10 Capela de fluxo contínuo;

8.5.11 Capela de fluxo laminar;

8.5.12 Estufa;

8.5.13 Agitador de tubos (opcional);

8.5.14 Pipetas monocanais de 1-10 µl, 10-100 µl e 200-1000 µl, ou similares;

8.5.15 Vidraria de laboratório;

8.5.16 Armário para estoque dos reagentes e soluções;

8.5.17 Microscópio óptico;

8.5.18 Medidor de pH;

8.5.19 Balança analítica;

8.5.20 Autoclave;

8.5.21 Destilador; e

8.5.22 Deionizador (opcional).

9. DO RESPONSÁVEL TÉCNICO (RT) TITULAR E SUBSTITUTO

9.1 O RT titular e seu substituto, designados pelo laboratório deverão ser submetidos a treinamento, no

laboratório de referência, na técnica utilizada;

9.2 Após o treinamento e para efeito de credenciamento ou monitoramento, o RT titular e seu eventual substituto, serão submetidos a auditorias técnicas com acompanhamento do ensaio no próprio laboratório, realizadas por auditores designados pelo MAPA;e

9.3 Os laudos laboratoriais e o relatório mensal deverão ser, obrigatoriamente, assinados pelo responsável técnico titular ou seu substituto.

10. DOS PROCEDIMENTOS PARA O DIAGNÓSTICO PELA TÉCNICA DE IHQ

10.1 A fixação e descontaminação do material devem ser realizadas como se segue:

10.1.1 Os tecidos frescos devem ser fixados em formalina a 10% (dez por cento), preferencialmente tamponada. O cérebro e linfonodos inteiros necessitam de, pelo menos, três a cinco dias de fixação antes de serem clivados. Biópsia de linfonodos requer, pelo menos, dois dias de fixação. Fragmentos de tecidos que tenham espessura em torno de sete milímetros podem ser fixados em um dia;

10.1.2 Após o tempo necessário à fixação, os tecidos são clivados em fragmentos de aproximadamente dois milímetros de espessura e colocados em cassetes para inclusão;

10.1.3 Os tecidos são descontaminados em uma solução de ácido fórmico variando de 95% a 98% (noventa e cinco a noventa e oito por cento) por uma hora, em uma cabine de fluxo contínuo. Os cassetes devem estar totalmente imersos na solução;

10.1.4 Enxaguar rapidamente os tecidos por três vezes em dez volumes de água e, em seguida, submetê-los a lavagem contínua em água corrente até a total eliminação do odor do ácido;

10.1.5 Enxaguar em água bidestilada ou deionizada por dez minutos; e

10.1.6 Colocar os cassetes em solução de formalina fresca tamponada a 10%, (dez por cento) por vinte e quatro horas.

10.2 Do processamento e inclusão dos tecidos em parafina:

10.2.1 O material, depois de clivado, deverá ser processado rotineiramente para exame histológico. Este poderá ser feito em processador automático de tecidos (histotécnico) ou manualmente, regulado conforme as conveniências do laboratório, mas obedecendo, em geral, os tempos abaixo discriminados:

CUBAS	REAGENTES	TEMPO DE IMERSÃO
Copo Becker 1	Álcool 95% (formol)	1h00min
Copo Becker 2	álcool 95%	1h00min.
Copo Becker 3	álcool 95%	1h00min.
Copo Becker 4	álcool absoluto	1h00min.
Copo Becker 5	álcool absoluto	1h00min.
Copo Becker 6	Xilol	1h00min.
Copo Becker 7	Xilol	1h00min.
Copo Becker 8	Xilol	1h00min.
Estufa 1	Parafina	1h30min.
Estufa 2	Parafina	1h30min.

10.2.2 Após o processamento descrito acima é feita a inclusão do material em parafina a uma temperatura variando de 58° a 65°C (cinquenta e oito a sessenta e cinco graus celsius).

10.3 Da Preparação dos Cortes Histológicos e Lâminas:

10.3.1 A amostra a ser testada e os controles da prova nos blocos de parafina são cortadas em quatro a seis micrômetros de espessura e colocados em lâminas especiais com carga elétrica (tipo Probe On Plus), seguindo as orientações de uso do fabricante. Devem ser utilizadas duas lâminas controle positivo e duas lâminas controle negativo:

10.3.1.1 Como controle positivo devem ser usados tecidos de animais comprovadamente positivos para Scrapie, inativados com Ácido Fórmico variando de 95% a 98% (noventa e cinco a noventa e oito por cento) por uma hora;

10.3.1.2 No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe as lâminas devem ser pareadas de maneira que forme um espaço capilar, com as partes pintadas fazendo contato, e colocadas no suporte próprio para lâminas (tipo Slide Holder);

10.3.2 Para remoção da parafina as lâminas podem ser colocadas na estufa a 65°C (sessenta e cinco graus celsius) por vinte minutos; e

10.3.2.1 No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe, após este período, as lâminas são imersas em xilol, por dez minutos a 65°C (sessenta e cinco graus celsius), trocar o xilol e imergi-las por mais três minutos a 65°C (sessenta e cinco graus celsius) e realizar três enxágües rápidos.

10.4 A reidratação dos tecidos deve ser procedida na forma seguinte:

10.4.1 Lavar em xilol por cinco minutos; Lavar em álcool absoluto por dois minutos;

10.4.2 Lavar em álcool 95% (noventa e cinco por cento) por dois minutos;

10.4.3 Lavar em álcool 80% (oitenta por cento) por dois minutos;

10.4.4 Lavar em álcool 70% (setenta por cento) por um minuto.

10.5 Para o bloqueio da peroxidase endógena devem ser tomadas as seguintes providências:

10.5.1 Enxaguar as lâminas com uma solução de água oxigenada (H₂O₂) e metanol a três por cento (1ml de H₂O₂ a 30% em 30ml de metanol) preparada antes do uso;

10.5.2 Incubar por dez minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius) com a mesma solução; e

10.5.3 Enxaguar as lâminas submergindo-as quatro vezes em água deionizada ou bidestilada. Se necessário, as lâminas podem ficar algumas horas submersas em água.

10.6 Para a ativação do antígeno devem ser tomadas as seguintes providências:

10.6.1 Incubar os tecidos em uma solução de ácido fórmico 95% (noventa e cinco por cento) por cinco minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius), em um recipiente resistente ao ácido;

10.6.2 Lavar cuidadosamente e neutralizar em tampão Tris-HCl, usando três enxágües rápidos, seguido de incubação por um minuto em tampão fresco. O pH do lavado final deve ficar entre 7 e 8 (sete e oito).

Para o controle do pH, colocar as lâminas sobre um papel medidor de pH e continuar as lavagens até atingir o pH adequado;

10.6.3 Transferir o suporte com as lâminas para um recipiente resistente ao calor, contendo solução tampão adequada;

10.6.4 Tampar o recipiente, envolvê-lo em papel alumínio e autoclavar a 121°C (cento e vinte e um graus celsius) por vinte minutos. A contagem do tempo é iniciada quando a temperatura atinge 121°C (cento e

vinte e um graus celsius); e

10.6.5 Transferir as lâminas para o tampão Tris com tween20 (TBST) por dez minutos. Se necessário, as lâminas podem ser mantidas em tampão por algumas horas.

10.7 As providencias para a coloração Imuno-histoquímica devem ser as seguintes:

10.7.1 Nesta etapa a temperatura ambiente deve ser mantida entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.2 Agregar a solução de proteinase K sobre o corte do tecido na lâmina e incubar por um minuto. Enxaguar três vezes por vinte segundos, em TBST;

10.7.2.1 No caso de utilizar o sistema do tipo MicroProbe agregar 150 (cento e cinquenta) microlitros de solução de proteinase K em um pocinho dosificador tipo Isolon e incubar por um minuto;

10.7.3 Enxaguar três vezes por vinte segundos, em TBST;

10.7.4 Agregar o anticorpo monoclonal F99/97.6.1 diluído conforme recomendações do fabricante, em diluente de anticorpo e preparado no dia do uso, incubando por dez minutos;

10.7.5 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.6 Agregar o complexo Biotina-IgG anti-camundongo e incubar por dez minutos, entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.7 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.8 Agregar a Peroxidase-Estreptavidina ou Peroxidase

Avidina e incubar por dez minutos entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius);

10.7.9 Enxaguar com TBST, três vezes por vinte segundos;

10.7.10 Agregar substrato DAB cromógeno e incubar por quatro a cinco minutos;

10.7.11 Enxaguar com água destilada, duas vezes por vinte segundos;

10.7.12 Contracorar com hematoxilina;

10.7.13 Enxaguar com água corrente, três vezes por vinte segundos;

10.7.14 Deixar em água corrente entre dois a cinco minutos até atingir a coloração azulada:

10.7.14.1 Este processo pode ser substituído submergindo as lâminas cinco vezes em banho contendo uma solução de hidróxido de amônio ou Scotts Water Substitute;

10.7.15 Enxaguar com água corrente, duas vezes por vinte segundos; e

10.7.16 Deixar as lâminas na água até começar a montagem com lamínula.

10.8 Para a desidratação dos tecidos deve ser providenciado o seguinte:

10.8.1 Lavar em álcool 70% (setenta por cento) por dois minutos;

10.8.2 Lavar em álcool 80% (oitenta por cento) por dois minutos;

10.8.3 Lavar em álcool 95% (noventa por cento) por dois minutos;

10.8.4 Lavar em álcool absoluto por dois minutos;

10.8.5 Lavar em xilol por cinco minutos; e

10.8.6 Lavar em xilol por cinco minutos.

10.9 Montar as lâminas utilizando bálsamo do Canadá natural ou sintético para fixar a lamínula.

10.10 Ler em microscópio óptico.

10.11 Registrar o resultado.

11. DO MANEJO DOS REATIVOS

11.1 Anticorpos:

11.1.1 A solução Estoque de anticorpos, em uso, deve ser armazenada entre 2° e 7°C (dois e sete graus celsius);

11.1.2 Não são recomendados o congelamento e o descongelamento repetidos;

11.1.3 Os anticorpos são diluídos no dia do uso e mantidos sob refrigeração; e

11.1.4 O congelamento de anticorpos pré-diluídos, especialmente quando estão combinados, não é recomendado.

11.2 Substrato Cromógeno DAB 11.2.1 Utilizar conforme recomendações do fabricante;

11.2.3 Deve ser mantido sob refrigeração até o seu uso; e

11.2.4 Se apresentar um precipitado deve ser bem agitado antes do uso.

11.3 Tampão TRIS-HCl a 0.1 M 11.3.1 Dissolver 12,1 (doze virgula um) gramas de Tris base em 800ml (oitocento mililitro) de água bidestilada;

11.3.2 Ajustar o pH para 7,6 (sete virgula seis) com HCl concentrado e completar para um litro; e

11.3.3 Pode ser mantido em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

11.4 Tampão Tris com Tween20 (Tbst)

11.4.1 Adicionar 6,06 (seis virgula zero seis) gramas de Tris base e 17,5 (dezessete virgula cinco) gramas de Cloreto de Sódio (NaCl) em 800ml (oitocentos mililitro) de água bidestilada;

11.4.2 Ajustar o pH para 7,6 (sete virgula seis) com Ácido Clorídrico (HCl) concentrado e completar para um litro de água, homogeneizando bem;

11.4.3 Adicionar 1ml (um mililitro) de Tween20 e homogeneizar evitando formar espuma; e

11.4.4 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

11.5 Solução de Hidróxido de Amônia

11.5.1 Adicionar 2,5ml (dois virgula cinco mililitro) de Hidróxido de amônia 14,8 N em um litro de água

bidestilada; e

11.5.2 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius) em frasco com tampa para evitar a evaporação.

11.6 Scott'S Water Substitute

11.6.1 Diluir dez gramas de Sulfato de Magnésio em um litro de água bidestilada; e

11.6.2 Conservar em temperatura variando entre 22° e 25°C (vinte e dois e vinte e cinco graus celsius).

ANEXO III

INFORMAÇÕES QUE DEVEM CONSTAR DO LIVRO DE REGISTRO DE AMOSTRAS PELA TÉCNICA DE IHQ

1. Número do exame IHQ;
2. Número no DXSNC;
3. Número do protocolo;
4. Nome e endereço do remetente;
5. Nome do responsável pelo recebimento;
6. Nome e endereço do proprietário do animal;
7. Número do Animal;
8. Espécie, raça, sexo e idade do animal;
9. Data de encaminhamento da amostra;
10. Data de entrada;
11. Data de saída; e
12. O resultado.

ANEXO IV

MODELO DE FORMULÁRIO DE LAUDO DE RESULTADO DE EXAME PELA TÉCNICA DE IHC

Nº do Protocolo Remetente:	Categoria de exame:
-------------------------------	---------------------

Espécie:	Raça:	Sexo:	Idade:
----------	-------	-------	--------

Proprietário:	Procedência:
---------------	--------------

Data de entrada:	Data de encaminhamento:	Número de blocos:	Data de saída:
------------------	-------------------------	-------------------	----------------

Remetente:

Endereço do órgão requisitante:

Histórico:

Diagnóstico:

Assinatura:	
Responsável técnico:	
	Data:

D.O.U., 23/03/2004

RET., 25/03/2004

ANEXO 4 – INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 2 DE ABRIL DE 2008,
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 2 DE ABRIL DE 2008

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006, no Decreto nº 24.548, de 3 de julho de 1934, na Portaria nº 516, de 9 de dezembro de 1997, e o que consta do Processo nº 21000.014191/2006-61, resolve:

.Art. 1º Aprovar os Procedimentos para a Atuação em Caso de Suspeita ou Ocorrência de Paraplexia Enzoótica dos Ovinos (scrapie), Anexo I, o Termo de Responsabilidade, Anexo II, e o Questionário de Investigação Epidemiológica, Anexo III.

.Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

REINHOLD STEPHANES

ANEXO I

PROCEDIMENTOS PARA A ATUAÇÃO EM CASO DE SUSPEITA OU OCORRÊNCIA DE PARAPLEXIA ENZOÓTICA DOS OVINOS (SCRAPIE)

CAPÍTULO I

DOS OBJETIVOS E DAS DISPOSIÇÕES GERAIS

Art. 1º Estabelecer os procedimentos para a atuação em caso de suspeita ou ocorrência de Paraplexia Enzoótica dos Ovinos (scrapie) nas espécies ovina e caprina.

Art. 2º Considera-se scrapie uma enfermidade neurodegenerativa, transmissível e fatal que acomete ovinos e caprinos, pertencente ao grupo das encefalopatias espongiiformes transmissíveis EET.

Art. 3º A scrapie é de notificação compulsória e sua suspeita ou ocorrência devem ser imediatamente informadas à autoridade de defesa sanitária animal de quaisquer das instâncias (Central e Superior, Intermediárias e Locais) do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Art. 4º São considerados animais com suspeita clínica de scrapie os ovinos e caprinos, maiores de 12 (doze) meses de idade, que apresentam ou apresentaram sinais clínicos nervosos tais como mudanças no comportamento, na locomoção e na postura, com apresentação isolada ou conjunta, persistentes por mais de 15 (quinze) dias.

Parágrafo único. Considera-se como suspeita clínica fundamentada de scrapie aquela que persiste após investigação clínica, epidemiológica e diferencial para outras doenças, tais como sarna e outros ectoparasitos, cenurose, raiva, pseudo-raiva, pneumonia ovina progressiva (maedi-visna), listeriose encefálica, polioencefalomalacia, toxemia da prenhez, fotossensibilização, hipomagnesemia, intoxicação por substâncias químicas ou por plantas, entre outras.

Art. 5º São considerados animais com diagnóstico para scrapie os ovinos e caprinos com resultado positivo à prova de imunistoquímica (IHQ) em amostras de tecido nervoso ou linfóide, ou por meio de outras técnicas diagnósticas e metodologias aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

Parágrafo único. As amostras colhidas para o diagnóstico da scrapie deverão ser encaminhadas aos laboratórios de diagnóstico das EET pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, acompanhadas do Formulário Único de

Requisição de Exame para Síndrome Neurológica de que trata a Portaria SDA nº 168, de 27 de setembro de 2005.

Art. 6º Todos os proprietários ou detentores de ovinos e caprinos suspeitos, positivos, de alto risco ou expostos à scrapie são responsáveis por sua guarda, devendo assinar o Termo de Responsabilidade constante do Anexo II desta Instrução Normativa.

Art. 7º A Comissão de Avaliação dos animais sujeitos à indenização será designada pela Superintendência Federal de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - SFA da Unidade Federativa, na forma da Lei nº 569, de 21 de dezembro de 1948.

Parágrafo único. Não caberá qualquer indenização por animais sacrificados e que venham a se confirmar, laboratorialmente, casos de scrapie.

CAPÍTULO II

DA ATUAÇÃO EM CASO DE SUSPEITA CLÍNICA DE SCRAPIE

Art. 8º Diante da suspeita clínica de scrapie, as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas Instâncias Intermediárias ou Locais do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - visita ao estabelecimento e fundamentação da suspeita, a partir da investigação clínica-epidemiológica do rebanho;

II - em caso de suspeita clínica fundamentada, deverão ser realizadas as seguintes ações:

a) interdição do estabelecimento, que consiste na proibição do ingresso e egresso de ovinos e caprinos, bem como produtos, subprodutos e materiais que venham a constituir via de transmissão ou propagação da scrapie;

b) aplicação do Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução Normativa;

c) colheita de amostras de animais suspeitos e notificação à Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária competente pela Unidade Federativa de origem da suspeita, por meio do formulário de atendimento inicial estipulado pelo Departamento de Saúde Animal - DSA/SDA/MAPA.

1. no caso de animal suspeito vivo, deve-se proceder à colheita de terceira pálpebra e de outro tecido linfóide julgado necessário;

2. no caso de animal suspeito morto, ou quando o proprietário optar pelo sacrifício sanitário do animal enfermo, deve-se proceder à colheita de tecido nervoso, incluindo o tronco encefálico, de tecido linfóide, incluindo a terceira pálpebra, e de outros tecidos julgados necessários durante a necropsia;

Art. 9º Os animais suspeitos submetidos ao teste em tecido linfóide deverão permanecer em observação, e em isolamento no caso de fêmeas, até a conclusão dos resultados laboratoriais.

Art. 10 No caso de resultados laboratoriais negativos em testes realizados apenas em tecido linfóide, os animais suspeitos deverão ser mantidos em observação, e em isolamento no caso de fêmeas, por mais 15 (quinze) dias.

§ 1º Ao fim do período citado no caput deste artigo, não havendo regressão dos sinais clínicos, os animais suspeitos deverão ser avaliados pela Comissão de Avaliação e submetidos ao sacrifício sanitário para colheita de amostras de tecido nervoso.

§ 2º Em caso de regressão dos sintomas ao fim do período citado no caput deste artigo, o estabelecimento

deverá ser imediatamente desinterditado, sendo a suspeita encerrada por meio do formulário de atendimento complementar, estipulado pelo Departamento de Saúde Animal - DSA/SDA/MAPA.

Art. 11 No caso de resultados laboratoriais negativos em testes realizados em amostras de tecido nervoso, o estabelecimento deverá ser imediatamente desinterditado, sendo a suspeita encerrada por meio do formulário de atendimento complementar.

Art. 12 No caso de não haver condições técnicas de colheita de amostras em animal suspeito morto, registros adequados e auditáveis sobre o atendimento deverão ser mantidos pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e, a critério desta, o estabelecimento poderá ser desinterditado e ser alvo de vigilância rotineira.

Art. 13 Caberá ao proprietário ou detentor a aplicação de identificação individual nos animais citados nos arts. 9º e 10 deste Anexo.

Parágrafo único. O dispositivo para a identificação individual citada no caput deste artigo será proposto pela Instância Intermediária do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e aprovado pela competente SFA.

Art. 14 Os animais suspeitos mortos ou submetidos ao sacrifício sanitário deverão ser destruídos sob a supervisão da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

CAPÍTULO III

DA ATUAÇÃO EM CASO DE OCORRÊNCIA DE SCRAPIE

Art. 15 Diante de resultados laboratoriais positivos para scrapie, o estabelecimento será considerado como Propriedade Foco e as seguintes medidas deverão ser adotadas pelas Instâncias Intermediárias ou Locais do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária:

I - interdição do estabelecimento;

II - aplicação do Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução Normativa;

III - notificação à Instância Central e Superior do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária competente pela Unidade Federativa de origem da ocorrência;

IV - no caso dos animais positivos estarem vivos, estes devem ser submetidos ao processo de sacrifício sanitário:

a) o sacrifício sanitário consiste na eliminação dos animais seguida da destruição das carcaças por incineração, enterramento ou qualquer outro procedimento aprovado pelo MAPA, realizado sob supervisão da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária no próprio estabelecimento de criação ou em outro estabelecimento por ela indicado;

V - identificação individual e isolamento dos animais de alto risco, que são: a avó, a mãe, as irmãs maternas e as fêmeas descendentes de uma fêmea com resultado laboratorial positivo para scrapie; a avó, a mãe e as irmãs maternas de um macho com resultado laboratorial positivo para scrapie; e outros animais, a critério da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária;

VI - avaliação pela Comissão de Avaliação, sacrifício sanitário e colheita de amostras dos animais de alto risco;

VII - identificação individual e isolamento, a critério da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, dos animais expostos, que são todos aqueles que possam ter entrado em contato com os materiais expelidos pelo parto quando do nascimento, na parição ou no aborto de

animal positivo para scrapie, de acordo com o manejo reprodutivo da propriedade;

VIII - colheita de amostra de tecido linfóide dos animais expostos com mais de 12 (doze) meses de idade;

IX - avaliação pela Comissão de Avaliação e sacrifício sanitário dos animais expostos com menos de 12 (doze) meses de idade.

§ 1º A pedido do proprietário ou detentor e a critério da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, os animais expostos com menos de 12 (doze) meses de idade poderão ser mantidos no estabelecimento em que se encontram até que essa idade seja alcançada, quando deverão ser submetidos ao procedimento estabelecido no inciso VIII deste artigo.

§ 2º Os animais expostos que resultarem positivos ao exame de tecido linfóide serão submetidos aos procedimentos descritos no inciso IV deste artigo.

§ 3º Os animais expostos que resultarem negativos ao exame de tecido linfóide deverão ser alvo de vigilância pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

§ 4º Caberá ao proprietário ou detentor a aplicação de identificação individual nos animais citados nos incisos V e VII deste artigo, mediante dispositivo de identificação proposto pela Instância Intermediária do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária e aprovado pela competente SFA.

Art. 16 Durante a interdição do estabelecimento somente será permitido o trânsito de egresso de animais destinados ao abate sanitário, desde que esses animais não estejam envolvidos na investigação epidemiológica como positivos, de alto risco ou expostos.

Parágrafo único. O abate sanitário citado no caput deste artigo será realizado em estabelecimento inspecionado e devidamente registrado no órgão competente municipal, estadual ou federal, com aproveitamento de carcaça e com remoção e destruição dos materiais de risco específico (cérebro, medula espinhal, olhos, tonsilas, baço e intestino desde o duodeno até o reto).

Art. 17 Após a conclusão das ações estabelecidas no art. 15 deste Anexo e a critério da competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, o estabelecimento poderá ser desinterditado e o foco encerrado por meio do formulário de atendimento complementar.

CAPÍTULO IV

DAS PROPRIEDADES EXPOSTAS

Art. 18 Propriedades expostas são aquelas que possuem animais de alto risco ou expostos, e que, em caso de confirmação laboratorial de scrapie, passam a ser consideradas Propriedades Foco.

§ 1º As propriedades expostas devem ser interditadas e submetidas ao Questionário de Investigação Epidemiológica, segundo o Anexo III desta Instrução Normativa.

§ 2º Os animais de alto risco ou expostos que se encontram nas propriedades expostas deverão ser submetidos aos procedimentos estabelecidos nos incisos V a IX do art. 15 deste Anexo.

ANEXO II

TERMO DE RESPONSABILIDADE

Declaro que possuo sob minha responsabilidade ovinos ou caprinos considerados suspeitos, positivos, de alto risco ou expostos à paraplexia enzoótica dos ovinos - scrapie e, visando evitar a difusão da doença no País, comprometo-me a não comercializar ou transferir da propriedade os animais em questão, bem como informar à competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, qualquer alteração na situação dos mesmos, tais como:

- Doença;
- Morte;
- Fuga;
- Roubo ou furto.

Declaro, ainda, que tenho ciência de que o descumprimento parcial ou integral do presente termo, acarretará sanções conforme legislação vigente.

Proprietário: _____ CPF/CGC: _____ Propriedade: _____
 Telefone (____) _____ Município: _____
 Estado: _____ Número total de animais: _____ (_____).

Identificação dos animais:

Espécie	Identificação individual (*)	Nome	Sexo	Data de nascimento	Raça

(*) Aprovado pela competente Instância do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária.

Local e data

Assinatura do proprietário

ANEXO III

QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

ANEXO III
QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

1. IDENTIFICAÇÃO DO ESTABELECIMENTO			
1. Nome do proprietário ou responsável:			
2. Nome da propriedade:			
3. Coordenadas geográficas:			
4. Nome ou identificação do retiro/sub retiro (se houver):			
5. Endereço completo:			
6. Município:		7. UF:	
8. Endereço para correspondência:			
9. Município:		10. UF:	11. CEP:
12. Telefones:			
13. Endereço Eletrônico:			
2. DADOS DE MANEJO DO ESTABELECIMENTO			
14. Espécies:		<input type="checkbox"/> caprina	<input type="checkbox"/> ovina
15. Raça(s):			
16. Finalidade:		<input type="checkbox"/> Subsistência <input type="checkbox"/> Comercial	<input type="checkbox"/> Subsistência <input type="checkbox"/> Comercial
		<input type="checkbox"/> Carne <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Carne e leite	<input type="checkbox"/> Carne <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Carne e leite
		<input type="checkbox"/> Cria <input type="checkbox"/> Recria <input type="checkbox"/> Engorda	<input type="checkbox"/> Cria <input type="checkbox"/> Recria <input type="checkbox"/> Engorda
17. Número de animais no rebanho:		F < 1 ano:	M < 1 ano:
		F > 1 ano:	M > 1 ano:
		Total F:	Total M:
18. Área (hectares):			
19. Início da criação:			
20. Origem dos primeiros animais:		<input type="checkbox"/> nacional: _____ (UF)	<input type="checkbox"/> nacional: _____ (UF)
		<input type="checkbox"/> importada: _____ (país)	<input type="checkbox"/> importada: _____ (país)
21. Manejo reprodutivo da espécie exposta:			
a. Estação de partição: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim - Duração: _____ dias - Período do ano: _____			
b. Local de partição: <input type="checkbox"/> Campo <input type="checkbox"/> Piquete <input type="checkbox"/> Outro: _____			
c. Tempo de permanência no local de partição: Pré-parto: _____ dias - Pós-parto: _____ dias			
d. Destino da placenta: <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/> Inteiro <input type="checkbox"/> Incineração <input type="checkbox"/> Outro:			
3. IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL AFETADO			
22. Espécies: <input type="checkbox"/> caprina <input type="checkbox"/> ovina		23. Raça:	
24. Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F		25. Data de nascimento ou idade:	
26. N° registro:		27. Tatuagem/Brisas:	
4. HISTÓRICO DA ENFERMIDADE			
28. Data de início dos sinais clínicos:		29. Data da morte:	
30. Sinais clínicos: <input type="checkbox"/> Autamutilação <input type="checkbox"/> Cegueira <input type="checkbox"/> Decúbito <input type="checkbox"/> Incoordenação motora			
<input type="checkbox"/> Movimentação lateral da cabeça <input type="checkbox"/> Mudança de comportamento <input type="checkbox"/> Olhar fixo <input type="checkbox"/> Perda de lã ou pelo			
<input type="checkbox"/> Perda de peso acentuada <input type="checkbox"/> Prurido <input type="checkbox"/> Ranger dos dentes <input type="checkbox"/> Reflexo de morder <input type="checkbox"/> Tremor leve			
31. Descrição dos sinais clínicos (se necessário):			
32. Médico Veterinário responsável pelo diagnóstico clínico:			
Nome:			
CRMV:			
5. RASTREAMENTO DOS ANIMAIS AFETADOS			

33. Nascido na propriedade? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (indicar propriedade, município e UF de origem):
34. Identificação individual e relação de parentesco dos animais de alto risco existentes na propriedade:
35. Identificação individual, relação de parentesco e destino dos animais de alto risco movimentados para outras propriedades:
36. Identificação individual dos animais expostos existentes na propriedade:
37. Identificação individual e destino dos animais expostos movimentados para outras propriedades:
Local e data:
Identificação e assinatura do Médico Veterinário Oficial: