

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – CIÊNCIA ANIMAL**

LUCAS DE SOUZA QUEVEDO

SCRAPIE EM OVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

**LAGES
2023**

LUCAS DE SOUZA QUEVEDO

SCRAPIE EM OVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Renata Assis Casagrande

**LAGES, SC
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

QUEVEDO, LUCAS
SCRAPIE EM OVINOS NO ESTADO DE SANTA
CATARINA / LUCAS QUEVEDO. -- 2023.
87 p.

Orientadora: Renata Assis Casagrande
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, , Programa de Pós-Graduação -- Selecionne --,
2023.

1. Ruminante. 2. prion. 3. encefalopatia espongiforme. 4.
patologia. I. Assis Casagrande, Renata. II. Universidade do
Estado de Santa Catarina, . Programa de Pós-Graduação --
Selecionne --. III. Título.

LUCAS DE SOUZA QUEVEDO

SCRAPIE EM OVINOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para parcial a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Renata Assis Casagrande

BANCA EXAMINADORA

Renata Assis Casagrande
Renata Assis Casagrande, Doutora (presidente)
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

Claudio Severo Lombardo Barros
Claudio Severo Lombardo Barros, Doutor
Universidade Federal de Santa Maria

Cláudia Salete Wisser
Cláudia Salete Wisser, Doutora
Universidade do Estado de Santa Catarina

David Driemeier
David Driemeier, Doutor
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Joandes Henrique Fonteque
Joandes Henrique Fonteque, Doutor
Universidade do Estado de Santa Catarina

Lages, 16 de novembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Luís e Rosane, por estarem do meu lado em todos os meus sonhos e dificuldades que enfrentei durante a graduação e as que ainda virão ao decorrer da minha vida. Sem vocês este sonho não seria possível, pois vocês me deram todo o apoio possível e impossível para que se concretizasse a minha formação, me dando confiança carinho e compreensão. Aos meus avós, José Carlos e Maria Helena que sempre me ajudou também em momentos importantes durante minha formação.

Meu irmão Pedro que sempre foi uma das minhas inspirações e por me dar apoio sempre que necessário, pois ele estava ali do meu lado.

Agradeço ao professor Bruno que sempre me apoiou nos primeiros passos na patologia. Todos os meus colegas de Laboratório do LPV-UNIPAMPA, LRD/UFPEL e LAPA/UDESC, que de alguma forma acrescentaram na minha formação. Um agradecimento especial a colega de trabalho, Anna Laura, que sempre me ajudou durante esses anos de Doutorado.

Um agradecimento especial a minha Orientadora Renata Assis Casagrande que me estendeu a mão em um dos momentos mais complicados durante essa caminhada.

Agradeço ainda a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina pela parceria estabelecida, a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de estudos e a Udesc por me proporcionar toda a infraestrutura e acolhimento que recebi por seus funcionários e professores durante esses 5 anos e meio.

RESUMO

Scrapie é uma doença contagiosa de ovinos e caprinos diagnosticada primeiramente no Brasil em 1978, no Rio Grande do Sul. Os príons são proteínas que possuem caráter infeccioso que ao entrar em contato com a forma normal da proteína (PrP^C), realiza a conversão em uma isoforma anormal associada à doença (PrP^{Sc}). O objetivo deste estudo foi realizar o monitoramento de *Scrapie* em ovinos na região do Alto Vale do Itajaí, SC. Três artigos científicos foram elaborados nesse período de estudo. No primeiro artigo foi realizada a descrição de um surto de *Scrapie* ocorrido em uma propriedade com 38 ovinos da raça Dorper e mestiços com Dorper, destes 16 (42,10%) apresentaram positividade na imuno-histoquímica (IHQ) anti- PrP^{Sc} de biópsias de tecidos linfoides e foram submetidos a eutanásia e necropsia. Uma fêmea desenvolveu sinal neurológico caracterizado por dificuldade em manter-se em estação, incoordenação dos membros pélvicos, decúbito esternal, além de prurido e áreas de alopecia bilateral na face lateral da coxa, com evolução de 11 dias até a eutanásia. Outras seis ovelhas também desenvolveram prurido e alopecia. A fêmea com sinal neurológico desenvolveu vacuolização no citoplasma de neurônios e neurópilo multifocal discreto. Na genotipagem do gene PRNP encontrou os genótipos ARQ/ARQ em 47,36% (9/19) (baixa resistência - grau 3), ARR/ARQ em 36,84% (7/19) (resistente - grau 2), ARQ/VRQ em 10,52% (2/19) (alta suscetibilidade - grau 5) e ARQ/VRR em 5,28% (1/19) (suscetível - grau 4). No segundo artigo relatou-se um caso atípico de *Scrapie* em um carneiro da raça Dorper. O ovino desenvolveu sinais clínicos atípicos da doença caracterizados por cifose, dificuldade em manter-se em estação, fasciculações e déficits proprioceptivos dos membros pélvicos e teste de “Scratch” positivo. Observou-se na histopatologia do encéfalo vacuolização no citoplasma de neurônios e neurópilo multifocal moderada na maioria das regiões avaliadas. O carneiro foi classificado como naturalmente suscetível (ARQ/ARQ). O terceiro artigo teve como objetivo associar o quadro clínico neurológico com a mensuração das alterações vacuolares observadas em diferentes regiões do encéfalo de ovinos diagnosticados com *Scrapie*. Foram avaliados três ovinos positivos para *Scrapie*. Na genotipagem do gene PRNP o ovino 1 apresentou baixa resistência (grau 3), ovino 2 alta suscetibilidade (grau 5) e ovino 3 resistente (grau 2). Os locais em que houve maior média de vacúolos em neurópilo foram nos ovinos 1 e 3 no tálamo e no ovino 2 na medula espinhal. Em neurônios a maior média foi observada em tálamo, colículos rostrais e córtex frontal nos ovinos 1, 2 e 3, respectivamente. O ovino 1 apresentou quadro clínico mais grave e desenvolveu cifose, dificuldade em manter-se em estação, fasciculações e déficits proprioceptivos dos membros pélvicos e teste de “Scratch” positivo. O ovino 2 desenvolveu tremores discretos de cabeça e perda de lã no lado direito nas regiões torácica e lombar dorsal, escapular e umeral, além da cervical. O ovino 3 apresentou prurido e alopecia na face. Portanto, *Scrapie* está presente em Santa Catarina, sendo importante diferenciar de outras causas neurológicas, pois os sinais clínicos podem ser inespecíficos. O grau de vacuolização pode influenciar nos sinais clínicos desenvolvidos nos animais.

Palavras-chave: Ruminante, príon, encefalopatia espongiforme, patologia.

ABSTRACT

Scrapie is a contagious disease of sheep and goats first diagnosed in Brazil in 1978, in Rio Grande do Sul. Prions are proteins that have an infectious character. When they come into contact with the normal form of the protein (PrP^{C}), they convert it into an abnormal isoform associated with disease (PrP^{Sc}). The objective of this study was to monitor *Scrapie* in sheep in the Alto Vale do Itajaí region, SC. We developed scientific papers during the study period. In the first article, a description of a *Scrapie* outbreak that occurred on a property with 38 Dorper sheep and Dorper crosses was described, of which 16 (42.10%) were positive by immunohistochemistry of biopsies of lymphoid tissues and euthanized and necropsied. One female developed a neurological sign characterized by difficulty in remaining in a standing position, incoordination of the pelvic limbs, sternal recumbency, in addition to scratching and areas of bilateral alopecia on the lateral surface of the pelvic limb, with an evolution of 11 days until euthanasia. Another six sheep also developed scratching and alopecia. The female with neurological signs developed discrete multifocal vacuolization in the neuronal soma and processes. Genotyping the PRNP gene, the genotypes ARQ/ARQ were found in 47.36% (9/19) (low resistance - grade 3), ARR/ARQ in 36.84% (7/19) (resistant - grade 2), ARQ/VRQ in 10.52% (2/19) (high susceptibility - grade 5) and ARQ/VRR in 5.28% (1/19) (susceptible - grade 4). In the second article, an atypical case of *Scrapie* was reported in a Dorper. The sheep developed atypical clinical signs of the disease characterized by kyphosis, difficulty standing, fasciculations and proprioceptive deficits in the pelvic limbs and a positive Scratch test. Histopathology, vacuolization in the cytoplasm of neurons and their processes was observed in the brain. The sheep were classified as naturally susceptible (ARQ/ARQ). The third article aimed to associate the neurological clinical picture with the measurement of vacuolar changes observed in different regions of the brain of sheep presented with *Scrapie*. Three positive sheep for *Scrapie* were evaluated. Genotyping the PRNP gene, sheep 1 showed low resistance (grade 3), sheep 2 showed high susceptibility (grade 5) and sheep 3 was resistant (grade 2). The regions where there was a higher average number of vacuoles in the neuropil were in the thalamus in sheep 1 and 3 and in the spinal cord of sheep 2. In neurons, the highest mean was observed in the thalamus, rostral colliculi and frontal cortex in sheep 1, 2 and 3, respectively. Sheep 1 developed a more severe condition and developed kyphosis, difficulty standing, fasciculations and proprioceptive deficits in the pelvic limbs and a positive Scratch test. Sheep 2 developed slight head tremors and wool loss on the right side in the dorsal thoracic, lumbar, scapular and humeral regions, and the cervical region. Sheep 3 presented scratching and alopecia on the face. Therefore, *Scrapie* is present in Santa Catarina, and it is essential to differentiate it from other neurological causes, as clinical signs can be nonspecific. The degree of vacuolization can influence the clinical signs developed in animals.

Keywords: Ruminant, prion, spongiform encephalopathy, pathology

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Scrapie* outbreak in sheep. (A) One-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep in sternal recumbency. The detail shows an area of alopecia on the lateral face of the thigh. (B) Adult crossbred Dorper female sheep with areas of alopecia in the lateral region of the thorax (arrow). (C) Adult Dorper crossbred female sheep positive for *Scrapie* with the placenta and uterine secretions in contact with other sheep.....41
- Figura 2.** *Scrapie* outbreak in sheep: One-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep. Rectal mucosal biopsy with moderate immunostaining in lymphoid follicles for PrP^{Sc}. Obj. 10.....42
- Figura 3.** *Scrapie* outbreak in sheep: Brain stem (obex) of one-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep. (A) discrete multifocal vacuolization of the neuropil (arrow). HE Obj. 40. (B) moderate immunostaining for PrP^{Sc} in the cytoplasm of neurons and neuropil. Obj. 40.43
- Figura 4.** A 3-year and 2-month-old male Dorper sheep with an atypical case of *Scrapie*A: Dog sitting posture and kyphosis. B: Dorsal decubitus after a fall in an attempt to remain in a standing position..... 55
- Figura 5.** A 3-year and 2-month-old male Dorper sheep with an atypical case of *Scrapie* A: Obex: multiple neurons with well-delimited round vacuoles of varying sizes (arrows); H&E stain; bar = 20 µm. B: Image enlarged at higher magnification of A; H&E stain; bar = 2 µm. .H&E, hematoxylin and eosin.....55
- Figura 6.** Cortes transversais e longitudinal de sistema nervoso central fixados em formalina a 10% de ovinos com *Scrapie*. Os pontos representam as áreas microscópicas avaliadas para mensuração de vacúolos. **A** – Corte transversal do lobo frontal: córtex frontal em amarelo substância cinzenta, em vermelho a substância branca. Núcleos da base em preto. **B** – Corte

transversal de diencéfalo: lobo parietal em amarelo substância cinzenta, em vermelho a sustância banca. Hipocampo: azul. Tálamo: preto. **C** - Corte transversal de córtex occipital em amarelo substância cinzenta, em vermelho a sustância branca. **D** - Corte longitudinal de cerebelo em amarelo camada granular, em vermelho camada molecular, em azul, células de Purkinge e em preto substância branca. **E** – Corte transversal de colículos rostrais foram avaliados área 1 em vermelho, 2 em amarelo, 3 em azul e 4 em preto. **F** – Corte transversal de ponte com pedúnculos cerebelares área 1 em vermelho, 2 em amarelo e 3 em azul–. **G** - Corte transversal de óbex, área 1 em vermelho, 2 em amarelo, 3 em azul e 4 em preto foram avaliad–s. **H** - Corte transversal de medula espinhal, vermelho e amarelo são os cornos dorsais e azul e preto cornos ventrais e substância branca lilás, rosa, laranja e verde.....63

Figura 7. Ovino, macho, Dorper, três anos com *Scrapie* em decúbito lateral direito.....65

Figura 8. A – Ovino, macho, mestiço Dorper, 2 anos com *Scrapie*. Nas setas indicam múltiplas áreas de perda de lã devido o prurido intenso no lado direito nas regiões torácica e lombar dorsal, escapular e umeral, além da cervical. B - Ovino, fêmea, mestiço Dorper com Santa Inês, 3 anos e seis meses com *Scrapie*: pele da região periocular abrangendo os ossos região dos ossos nasal, frontal e parietal com alopecia e deposição de crostas focalmente extensa.....66

Figura 9. Escore de graduação das médias de vacuolização por região de ovinos com *Scrapie*. 0 = sem vacuolização, escore 1 (discreta vacuolização), escore 2 (moderada vacuolização) e escore 3 (acentuada vacuolização).....67

Figura 10. Marcações das vacuolizações em sistema nervoso central de ovinos com *Scrapie*. Em vermelho vacuolização neuronal e em preto vacuolização em neurópilo. A – Ovino 2: Tálamo. B – Ovino 3: Hipocampo. C – Ovino 2: Cerebelo. D – Ovino 2: Colículos

rostrais. E – Ovino 2: Ponte. F – Ovino 1: Medula oblonga à altura do óbex.....	71
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Scrapie</i> outbreak in sheep in the state of Santa Catarina. Distribution and classification of PRNP gene genotypes according to the National <i>Scrapie</i> Surveillance Plan (USDA), 2010.....	44
Tabela 2. Média de vacuolização em neurópilo e neurônios das regiões avaliadas nas secções de encéfalo e medula espinhal de ovinos com <i>Scrapie</i>	68
Tabela 3. Sinais clínicos de ovinos com <i>Scrapie</i> no estado de Santa Catarina. Distribuição e classificação dos genótipos do gene PRNP de acordo com <i>National Scrapie Surveillance Plan</i> (USDA), 2010.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação dos diferentes genótipos do gene PRNP, quanto ao grau de resistência e suscetibilidade em ovinos à *Scrapie*.....21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
4 ARTIGO 1.....	24
5 ARTIGO 2.....	45
6 ARTIGO 3.....	56
7 CONCLUSÃO.....	81
8 REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina atualmente possui um rebanho de 311.541 cabeças de ovinos distribuídas em 12.140 propriedades, respectivamente (IBGE, 2019). É o décimo segundo estado em quantidade de ovinos no Brasil. Apesar da pequena extensão territorial, o estado de Santa Catarina é considerado um importante exportador de proteína animal (IBGE, 2019). A reduzida área territorial dessa unidade federativa exige técnicas de manejo sanitário e nutricional cada vez mais avançadas, em rebanhos com progressiva evolução do padrão zootécnico, decorrente do melhoramento genético (ACCS, 2019; IBGE, 2019).

Neste sentido é imprescindível o monitoramento constante de doenças parasitárias, virais, bacterianas, priônicas, fúngicas, dentre outras causas, as quais, devido a importância econômica e sanitária. Algumas dessas doenças podem causar restrições geralmente impostas pelo mercado externo ao país, não apenas no comércio de ovinos, mas também de bovinos, suínos e aves (BRASIL, 2009).

O órgão responsável por fiscalizar e monitorar as principais doenças dos animais de produção, em Santa Catarina é a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) com o trabalho dos veterinários do serviço oficial que atuam no estado.

Das doenças de notificação obrigatória destacam-se nos ovinos, as que comprometem o sistema nervoso central e cursam com sinais neurológicos. Por este motivo é de extrema importância o acompanhamento e o monitoramento desse grupo de doenças para ter conhecimento de sua ocorrência. A principal doença que deve ser considerada é a raiva que apesar de rara em ovinos pode ser diagnosticada (RISSI et al. 2008). A *Scrapie*, outra doença que cursa com quadro neurológico, possui alta capacidade de contaminação ambiental e pode causar restrições comerciais. A doença teve o seu primeiro relato no estado de Santa Catarina no ano de 2011 (OMSA, 2021).

Scrapie pode ser controlado com a eliminação de animais portadores, como acontece na Grã-Bretanha, onde o Plano Nacional de controle tem exercido um controle exemplar da doença. Este ocorre através da genotipagem de carneiros de forma voluntária por parte dos produtores, sendo que os ovinos

com o gene susceptível são abatidos e descartados (DAWSON; MOORE & BISHOP, 2008).

Scrapie é causado pelo acúmulo de uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) do príon celular (PrP) que é encontrado em vários tecidos e ancorada em glicolipídios localizados em membranas plasmáticas neuronais (CANTILE & YOUSSEF, 2015). *Scrapie* trata-se de uma condição grave que compromete o funcionamento do sistema nervoso central, é transmissível e possui susceptibilidade genética (MADSEN-BOUTERSE et al. 2018; CASSMAN et al. 2019).

O príon pode ser encontrado no trato alimentar e na placenta dos animais infectados, portanto pode ocorrer transmissão horizontal e vertical (HUNTER, 1997). Alimentos, pastagens, instalações ou equipamentos contaminados com o príon são consideradas importantes fontes de contaminação, pois esse é favorecido por sua resistência no ambiente (MILLER et al., 2004; TAMGÜNEY et al., 2012).

Devido à importância epidemiológica que o *Scrapie* possui e por ser uma doença de notificação obrigatória listada pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OMSA), é de extrema importância econômica o seu monitoramento (ALMEIDA et al., 2013). Estima-se que somente nos Estados Unidos a doença represente perdas anuais entre 10 e 20 milhões de dólares devido a suspensão de exportações de produtos oriundos de ovinos, reprodutores, sêmen e embriões, além de despesas com o descarte de carcaças e aumentos nos custos de produção (USDA-APHIS, 2010).

O monitoramento da *Scrapie* em Santa Catarina auxiliaria na diminuição da disseminação do príon. De acordo com a Organização Mundial da Saúde Animal há cinco surtos notificados no estado (OMSA, 2021). Os casos devem ser comunicados aos órgãos competentes sempre que houver suspeita, pois é uma doença de notificação obrigatória e os animais devem ser sacrificados se confirmado o diagnóstico (BRASIL, 2008; OMSA, 2021).

Algumas técnicas de diagnósticos são preconizadas para contribuir com as políticas de erradicação, que são *Western blot*, imuno-histoquímica (IHQ) e ensaio imunoensimático (ELISA) (OMSA, 2021). Nos casos pré-clínicos, é recomendado a realização de biópsia de terceira pálpebra e mucosa retal

contendo pelo menos três folículos linfoides para avaliação IHQ e ELISA (LEAL et al. 2012; KITTELBERGER, et al. et al., 2014; ANDRADE et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo retrospectivo dos casos de *Scrapie* em ovinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Animal do ano de 2017 a 2020 e classificar o grau de suscetibilidade dos animais por meio da genotipagem do gene PRNP. Realizar estudo prospectivo por meio do monitoramento das enfermidades que acometem o sistema nervoso central de ovinos notificadas a CIDASC na mesorregião do Vale do Itajaí com enfoque no diagnóstico de *Scrapie* nos anos de 2021 a 2023.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a.** Descrever os casos de *Scrapie* ocorridos de 2017 a 2020 enviados ao Laboratório de Patologia Animal do CAV/UDESC e realizar a genotipagem por meio de reação da cadeia da polimerase (PCR) do gene PRNP dos animais positivos;
- b.** Monitorar a ocorrência de *Scrapie* em ovinos na mesorregião do Vale do Itajaí, notificadas a CIDASC;
- c.** Realizar inquérito epidemiológico e coleta de amostras de terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos com quadros neurológicos suspeitos de *Scrapie* que foram notificados a CIDASC, seguido de exame imuno-histoquímico (IHQ) ou ensaio imunoenzimático (ELISA);
- d.** Submeter o sangue total dos animais positivos para *Scrapie* das propriedades foco para genotipagem por meio de PCR do gene PRNP;
- e.** Realização de necropsia e exame histopatológico com a graduação das lesões encefálicas dos ovinos positivos para *Scrapie* na IHQ ou ELISA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- SCRAPIE

Scrapie é uma doença infecciosa de ovinos e caprinos que tem como manifestações clínicas paresia, prurido e distúrbios locomotores (MARTINS et al. 2012). A enfermidade pertence ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EETs) ou doenças priônicas. O grupo das TSEs animais inclui *scrapie* de ovinos e caprinos, *encefalopatia espongiforme bovina* (BSE), *doença debilitante crônica* (CWD) de cervos e alces, *encefalopatia transmissível do vison* (TME), *encefalopatia espongiforme felina* (FSE) e *encefalopatia de ungulados exóticos* de ruminantes selvagens em cativeiro. As doenças causadas por príons em humanos incluem *kuru*; doença de Creutzfeldt-Jakob – CJD (com 4 tipos: *CJD esporádica*, *CJD familiar*, *CJD iatrogênica* e *variante cd DCJ [vDCJ]*); *doença de Gerstmann-Straussler-Scheinker* (GSS); e *insônia familiar fatal* (FFI). As doenças priônicas hereditárias em humanos são todas dominantes e associadas a mutações codificadoras do gene *PRNP*.

As EETs possuem como característica a deposição de uma forma alterada da proteína priônica (PrP^{Sc}) no tecido encefálico e evoluí para doença neurológica e morte (PRUSINER, 1998).

Após a ingestão da proteína priônica ocorre a infecção das placas de Peyer e a replicação pode ocorrer no tecido linfático associado ao intestino (GALT), posteriormente chega ao sistema nervoso central por meio de fibras nervosas autônomas que inervam o trato digestivo (ANDRÉOLETTI et al 2000). Ovinos com nove meses de idade e com genótipo suscetível criados em contato direto com animais infectados pelo príon demonstraram deposição da proteína em linfonodos (parotideal, mediastinal, hepático, pré-crural, retrofaríngeo, mandibular, pré-escapular, íleo-cecal), linfonodos mesentéricos (duodeno, jejuno e íleo), placas de Peyer (duodeno, jejuno, íleo e ceco), além de agregados linfoïdes de terceira pálpebra, baço e amígdalas palatinas (ANDRÉOLETTI et al 2000). Portanto, em animais com suspeita clínica de *Scrapie*, o diagnóstico pode ser realizado por meio de biópsias de terceira pálpebra (LEAL et al. 2012) ou mucosa retal (GONZÁLEZ et al., 2008) sem a necessidade da eutanásia no primeiro momento.

Os príons são proteínas que possuem caráter infeccioso que ao entrar em contato com a forma normal da proteína prión (PrP^c), presente nos tecidos normais dos mamíferos, principalmente em neurônios, realizam a conversão em uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) (PRUSINER, 1998). Após o ovino entrar em contato com príon seja por ingestão, inalação ou contato direto pelas membranas mucosas ou conjuntivas, ocorre a adesão às superfícies apicais das células epiteliais da mucosa, das células M, além de células dendríticas das mucosas das tonsilas, do trato digestivo e respiratório (LINDEN et al. 2008). Posteriormente, a PrP^{Sc} é fagocitada por células apresentadoras de抗ígenos como macrófagos e células dendríticas. Sugere-se que estas células nos centros germinativos de folículos das células B localizadas nas placas de Peyer e em outros tecidos linfoides associados ao intestino (GALT), realizem a entrega do príon (COBB & SUREWICZ, 2009). Por meio do sistema nervoso periférico (SNP) o príon consegue sair dos tecidos linfoides e ganhar o sistema nervoso central (SNC), além disso o baço ainda pode atuar como reservatório do príon (GLATZEL et al., 2001). Suspeita-se que o agente também possa se disseminar por via hematogênica (DONALDSON et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 2014).

Scrapie foi a primeira doença priônica a ser descrita em 1732, no Reino Unido (CANTILE & YOUSSEF, 2015). De acordo com a OMSA, somente a Austrália e a Nova Zelândia são livres, isso ocorre devido principalmente as restrições impostas a importação de animais (OMSA, 2019), apesar disso, no ano de 2016 houve um relato de *Scrapie* atípico na Austrália (COOK et al., 2016). A doença já foi relatada na América do Norte (VRENTAS et al., 2012) e na Europa, onde são realizados programas na tentativa de conter a propagação do príon (ORTIZ-PELAEZ et al., 2014). Na África do Sul seu primeiro relato foi no ano de 1966 (MERWE, 1966), e na Ásia a doença também já foi descrita (ONODERA et al., 1993). Na América do Sul a doença é diagnosticada com relativa frequência (OMSA, 2021).

A infecção horizontal ocorre principalmente por ingestão do príon, que pode ser secretado pela saliva e se espalhar rapidamente nas pastagens, cochos e fômites (SIGURDSON, 1954; MILLER et al., 2004; RYDER et al., 2004; TAMGÜNEYET al., 2012). Pode ocorrer ainda acúmulo da proteína priônica em restos placentários e a transmissão vertical em ovinos pode acontecer (GARZA et al., 2011). Portanto as infecções em ovinos e caprinos estão associadas, na

maioria das vezes, a épocas de parição devido a ingestão do agente juntamente com restos placentários (HUNTER, 1997). Embora se saiba que ocorre infecção de ovinos recém-nascidos pela placenta, a infecção vertical ainda não foi totalmente elucidada (SPIROPOULOS et al., 2014). A transmissão pela ingestão de leite por cabritos e cordeiros também já foi relatada (MADSEN-BOUTERSE et al., 2018).

Ao identificar quais células e moléculas estão envolvidas no transporte transepitelial do prón é possível estabelecer processos que influenciam na suscetibilidade à enfermidade, a partir disso, métodos de intervenções podem ser desenvolvidos (DONALDSON et al., 2012). Pode haver variação nas alterações encefálicas, como envolvimento de substância cinzenta ou substância cinzenta e branca, acúmulos intracelulares ou extracelulares, maior ou menor envolvimento de células gliais, estes acúmulos que dão origem a esta diversidade de fenótipos neuropatológicos (GONZÁLEZ et al., 2014). Sugere-se que estes padrões de lesões sejam alterados devido ao polimorfismo do gene PrP do hospedeiro ou pela cepa do prón, ou seja, a interação entre o prón e o hospedeiro (BECK et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2010).

A influência sobre o polimorfismo no gene da proteína priônica ovina (PrP^c) é que define a ocorrência natural da *Scrapie* (ROELS et al., 2004). O gene PrP^c de ovinos possui três exons 52, 98 e, 4028 nucleotídeos, que são separados por dois íntrons (2421 e 14031 nucleotídeos) (LEE et al., 1998). Portanto, o polimorfismo de alanina para valina no códon 136, glutamina para arginina no códon 171 e arginina para histidina no códon 154 contribui para a suscetibilidade de desenvolver sinais clínicos, fenômeno que acontece no exón 3 do gene (ROELS et al., 2004; DOWSON et al., 2008). Ocorrem combinações desses polimorfismos, os quais, combinam-se em cinco haplótipos ou alelos PrP^c (Tabela 1) (USDA, 2010).

Roels et al. (2004) em seu estudo classificaram os ovinos de acordo com o *National Scrapie Plan* quanto ao grau de suscetibilidade genética para o desenvolvimento de *Scrapie*. Nesta classificação os animais podem variar dentro de grupos de 1 a 5, onde o grupo 1 é considerado de extrema resistência à *Scrapie* e 5 é de alta susceptibilidade (Quadro 1). No estudo destes autores todos os ovinos positivos para *Scrapie*, pertenciam a grupos de risco do genótipo PrP com resistência moderada a alta sensibilidade (R3, R4 e R5). Já os ovinos

negativos para a enfermidade estavam incluídos principalmente nos grupos com alta resistência à *Scrapie* (R1 e R2).

Quadro 1. Classificação dos diferentes genótipos do gene PRNP, quanto ao grau de resistência e suscetibilidade em ovinos à *Scrapie*.

Grupo	Grau de resistência/suscetibilidade	Genótipos
R1	Extremamente resistente	ARR/ARR
R2	Resistente	ARR/AHQ; ARR/ARH ARR/ARQ
R3	Leve resistência	AHQ/AHQ; AHQ/ARH AHQ/ARQ; ARH/ARH ARH/ARQ; ARQ/ARQ
R4	Suscetível	ARR/VRQ
R5	Altamente suscetível	AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ

Adaptado: National *Scrapie* Surveillance Plan (USDA), 2010.

A suscetibilidade relativa ou resistência à *Scrapie* clássica depende do polimorfismo no gene da proteína prón, que determina a sequência de aminoácidos do hospedeiro, estes polimorfos que cursam com doença são bem definidos e desta forma os países que possuem programas de erradicação focam no aumento da incidência de alelos resistentes no combate ao *Scrapie* (GREENLEE, 2019). Portanto, a doença que sucede devido a isoforma anormal (PrP^{Sc}) pode ocorrer de forma clássica ou atípica (PRUSINER, 1991; GREENLEE, 2019). Assim, na forma clássica existem três sítios polimórficos principais no PrP que influenciam a susceptibilidade que são os códons 136 valina (V), 154 arginina (R) e 171 glutamina (Q) (GREENLEE, 2019). Já o *Scrapie* atípico possui apresentação clínica, características moleculares e distribuição de PrP^{Sc} , genótipos afetados e epidemiologia diferentes da forma clássica (BENESTAD et al., 2003; GREENLEE, 2019). O primeiro caso atípico documentado foi o Nor98 na Noruega, onde os ovinos afetados possuíam genótipos homozigotos $\text{A}_{136}\text{H}_{154}\text{Q}_{171}/\text{A}_{136}\text{H}_{154}\text{Q}_{171}$ (AHQ/AHQ) ou heterozigotos $\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}/\text{A}_{136}\text{H}_{154}\text{Q}_{171}$ (AHQ/ARQ). Normalmente os casos considerados

clássicos possuem como referência para o desenvolvimento da enfermidade e ocorrem no genótipo PrP suscetível (ARQ/ARQ) (BENESTAD et al., 2003).

Ovinos Hampshire Down, Dorper, White Dorper e animais mestiços com essas raças são considerados predispostos ao desenvolvimento da doença, pois há associação com a maior suscetibilidade genética (FERNANDES; REAL & FERNANDES, 1978; ANDRADE et al. 2015). Outras raças que possuem associação a suscetibilidade genética incluem Santa Inês (raça mais criada no Brasil), (MCMANUS et al., 2010; IANELLA et al. 2012), Suffolk (HAMIR et al. 2005), Cheviot e Poll Dorset (HOUSTON et al. 2015).

Scrapie é uma doença progressiva e o período de incubação é geralmente superior a um ano e a maioria dos casos ocorrem entre dois e cinco anos de idade (MOORE et al., 2016). O período de incubação ainda pode ser correlacionado com a quantidade de deposição de PrP^{Sc}, e a evolução pode durar de 10 dias a meses (CANTILE & YOUSSEF, 2015; CASSMANN et al., 2019). Os sinais clínicos são caracterizados principalmente por distúrbios neurológicos como ataxia, hipermetria, tremores e quedas com evolução progressiva. Uma das características marcantes da enfermidade e que pode auxiliar no diagnóstico é o teste de “scratch”, que consiste em coçar manualmente o dorso do animal que irá responder com reflexo de “mordiscar” (MARTINS et al., 2012). Os ovinos geralmente perdem peso, apresentam prurido e perda de lã (MARTINS et al., 2012). Macroscopicamente não são observadas alterações, entretanto, alguns indícios podem auxiliar na suspeita e no diagnóstico da doença, como estado corporal ruim e extensas áreas deslanadas (MARTINS et al., 2012).

Na avaliação histopatológica as lesões são caracterizadas por vacúolos redondos, bem delimitados e de diferentes diâmetros no pericário de neurônios e distribuídos pelo neurópilo principalmente na região de óbex, entretanto, também podem ocorrer no mesencéfalo, ponte, medula oblonga, cornos laterais e ventrais da medula, núcleo motor dorsal do nervo vago, já no cerebelo e córtex pode ser observada alteração espongiforme leve (MARTINS et al., 2012; GREENLEE et al., 2019). Na forma atípica Nor98, as lesões também são vacuolares principalmente no neurópilo, e alguns vacúolos intraneurais. A vacuolização do neurópilo geralmente ocorre na camada molecular do cerebelo e no córtex cerebral, em menor grau pode observar-se no tronco cerebral,

entretanto, não há alterações vacuolares no óbex (BENESTAD et al., 2003). Cabe ressaltar que os quadros de *Scrapie* leva a morte neuronal sucessiva, crônica e não há processo inflamatório envolvido (KIMBERLIN, 1990). Os neurônios acometidos e prolongamentos neuronais apresentam vacuolização do citoplasma e dão aspecto de esponja na histologia (ALMEIDA et al., 2013). Na forma atípica (genótipo ARQ/ARR), observa-se no cerebelo alteração espongiforme das camadas molecular e granular (GREENLEE et al., 2019).

O diagnóstico de *Scrapie* pode ser realizado por meio da histopatologia, porém a confirmação deve ser pelo teste de imuno-histoquímica (IHQ), ensaio imunoensimático (ELISA) ou *western immunoblot* (OMSA, 2019b). No Brasil a positividade na IHQ em amostras de tecido nervoso ou linfoides é considerado o teste padrão para o monitoramento da doença e pode ser realizado em amostras de animais vivos de tecidos linfoides como terceira pálpebra e mucosa retal (BRASIL, 2009; LEAL et al., 2012).

Para avaliar a susceptibilidade dos ovinos, pode ser realizar a extração do DNA genômico a partir do sangue total dos animais. Nesta avaliação realizada por meio de teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) ocorre a amplificação de um fragmento de 245 pares de base (pb) onde estão localizados os principais códons (136 e 171) para a determinação da susceptibilidade ou resistência do ovino à *Scrapie* (ANDRADE, 2013).

No Brasil a doença foi diagnosticada primeiro no Rio Grande do Sul em 1978 de um animal importado da Inglaterra da raça Hampshire Down (FERNANDES; REAL & FERNANDES, 1978). Posteriormente os estados onde foram confirmados diagnóstico de *Scrapie* são Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Bahia e Santa Catarina (OIE, 2021). Em Santa Catarina os primeiros casos foram diagnosticados em 2011 seguidos de quatro surtos no ano de 2012, 2017 e 2019 (OIE, 2021). De acordo com a instrução normativa de número 15 de 2 de abril de 2008 é uma doença de notificação obrigatória, e o estabelecimento será considerado como propriedade foco e será interditada imediatamente, os ovinos positivos serão sacrificados e as carcaças incineradas ou enterradas ou qualquer outro procedimento aprovado pelo MAPA (BRASIL, 2008).

4 ARTIGO 1

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Use of immunohistochemistry and prion protein gene genotyping for detection of Scrapie in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil**”. Este artigo encontra-se publicado no periódico científico “*Ciência Rural*” com endereço de DOI: doi.org/10.1590/0103-8478cr20220633.

**Use of immunohistochemistry and prion protein gene genotyping for detection of
Scrapie in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil**

**Uso da imuno-histoquímica e genotipagem do gene da proteína priônica para
detecção de *Scrapie* em ovinos no estado de Santa Catarina, Brasil**

**Lucas de Souza Quevedo,¹ Caroline Pinto de Andrade,² Deise Hemckmeier,³
Karyna Giacomini,⁴ Fábio Ferreira,⁴ Thierry Grima de Cristo,¹ David Driemeier²
and Renata Assis Casagrande^{1*}**

ABSTRACT

Scrapie is a contagious disease of sheep and goats caused by prions (PrP^{Sc}). The first outbreak of *Scrapie* described in the State of Santa Catarina in 16 sheep on a property, where a 1 year and 3 month old sheep developed clinical signs characterized by motor incoordination of the pelvic limbs, pruritus and alopecia for three days. The 38 sheep from the flock that were over 1 year of age underwent biopsies of the third eyelid and rectal mucosa, in addition to anti- PrP^{Sc} immunohistochemistry (IHC). Blood containing EDTA was collected for PRNP gene genotyping from these sheep. IHC-positive animals were euthanized and necropsied (14 sheep), as well as lambs from positive mothers (5 lambs). Two animals over a year old died naturally and were not necropsied. Different organs of the 19 necropsied animals were collected in 10% buffered formalin for histopathological examination and anti- PrP^{Sc} IHC of the obex. Of the 38, 16 (42.10%) had immunostaining against anti- PrP^{Sc} . The histopathology of the obex of the female

^{1*} Santa Catarina State University (UDESC), Laboratory of Animal Pathology, Agroveterinary Science Center (CAV), Lages, SC, Brazil. Email: renata.casagrande@udesc.br. Corresponding author.

² Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Veterinary Pathology Sector, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Veterinarian at the City Hall of Pouso Redondo, Pouso Redondo, SC, Brazil.

⁴ Integrated Agricultural Development Company of Santa Catarina (CIDASC), Florianópolis, SC, Brazil.

presented vacuolization of the cytoplasm of neurons and neuropil. The anti-PrP^{Sc} IHC showed that two out of the 19 obex samples had cytoplasmic immunostaining in neurons. The genotypes found were ARQ/ARQ in 47.36%, ARR/ARQ 36.84%, ARQ/VRQ 10.52% and ARQ/VRR 5.28%. With genotyping, it is possible to identify susceptible animals and, in this way, select the flock with animals that are more resistant to the development of *Scrapie*. The clinical picture, anti-PrP^{Sc} IHC from lymphoid tissue biopsies, and genotyping demonstrate the high number of positive sheep classified in susceptible groups.

Keywords: Enzootic paraplexy, prion disease, small ruminants.

RESUMO

Scrapie é uma doença contagiosa de ovinos e caprinos causada por príons (PrP^{Sc}). O primeiro surto de tremor epizoótico descrito no estado de Santa Catarina em 16 ovinos em uma propriedade, onde uma ovelha de 1 ano e 3 meses desenvolveu sinais clínicos caracterizados por incoordenação motora dos membros pélvicos, prurido e alopecia durante três dias. Os 38 ovinos do rebanho que eram acima de 1 ano de idade foram submetidos a biópsias de terceira pálpebra e mucosa retal, além de imuno-histoquímica (IHQ) anti-PrP^{Sc}. Coletou-se sangue contendo EDTA para genotipagem do gene PRNP destes ovinos. Os animais positivos na IHQ foram eutanasiados e necropsiados (14 ovinos), bem como os cordeiros das mães positivas (5 cordeiros). Dois animais acima de um ano morreram naturalmente e não foram necropsiados. Diferentes órgãos dos 19 animais necropsiados foram coletados em formalina tamponada a 10% para exame histopatológico e IHQ anti-PrP^{Sc} do óbex. Dos 38 ovinos, 16 (42,10%) apresentaram imunomarcação na avaliação IHQ anti-PrP^{Sc}. Na histopatologia do óbex da fêmea havia vacuolização do citoplasma de neurônios e neurópilo. Na IHQ anti-PrP^{Sc} das 19 amostras

de óbex, dois apresentaram imunomarcação citoplasmática em neurônios. Os genótipos encontrados foram ARQ/ARQ 47,36%, ARR/ARQ 36,84%, ARQ/VRQ 10,52% e ARQ/VRR 5,28%). Com a genotipagem é possível identificar os animais susceptíveis e desta forma selecionar o rebanho com animais mais resistentes ao desenvolvimento do *Scrapie*. O elevado número de ovinos positivos para *Scrapie* é reflexo do alto número de animais classificados nos grupos susceptíveis resultando em um quadro clínico característico e avaliação de IHQ anti-PrP^{sc} de biópsias de tecidos linfoides positiva.

Palavras-chave: Paraplexia enzoótica, doença priônica, pequenos ruminantes.

INTRODUCTION

Scrapie is a neurodegenerative, progressive, and fatal transmissible spongiform encephalopathy, which naturally affects sheep and goats with progressive neuronal loss and a long incubation period (PRUSINER, 1991). The causative agent of the disease is a prion, which corresponds to an altered form of the normal prion protein (PrP^c) (PRUSINER, 1982). The abnormal isoform of cellular prion protein (PrP^{sc}) is characterized by deposition in several cell types of the host, mainly in the central nervous system and lymphoid tissues, forming protein aggregates, which are responsible for neurodegenerative disorders (ANDREOLETTI et al., 2000).

The first diagnosis of the disease in Brazil occurred in Rio Grande do Sul in 1978 in a Hampshire Down sheep (FERNANDES et al., 1978). Since then, the disease has been reported in Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Bahia, and Santa Catarina (OIE-WAHIS, 2021). The first cases in the State of Santa Catarina were diagnosed in 2011, followed by four outbreaks in 2012, 2017, and 2019 (OIE-WAHIS, 2021), although no outbreaks have been reported in the state.

The degree of genetic susceptibility to the development of *Scrapie* is considered important in the selection of animals resistant to the disease, this classification can vary from 1 to 5, where group 1 is considered extreme resistance to *Scrapie* and 5 is high susceptibility. (USDA-APHIS, 2010). Dorper, White Dorper and animals crossed with these breeds are associated with the highest genetic susceptibility (ANDRADE et al. 2015). Other breeds that are associated with genetic susceptibility are the Santa Inês breeds (the most bred breed in Brazil), (MCMANUS et al., 2010; IANELLA et al. 2012), Suffolk (HAMIR et al., 2005), Cheviot e Poll Dorset (HOUSTON et al., 2015).

Monitoring the disease and also susceptible genotypes are important available tools to prevent the prion spread (DAWSON et al., 2008). The diagnosis of the pre-clinical disease is performed by collecting a biopsy of the third eyelid or rectal mucosa because these places present lymphoid follicles where the prion protein accumulates and, therefore, an early diagnosis can be obtained (LEAL et al., 2012).

This is the first outbreak of *Scrapie* described in sheep in the state of Santa Catarina, Brazil, detected through ante-mortem and post-mortem diagnoses, in addition to categorizing sheep according to the degree of susceptibility and resistance through genotyping of the prion protein gene (PRNP).

MATERIAL AND METHODS

A technical visit was made to a property located in the municipality of Pouso Redondo, with a flock of approximately 60 Dorper and crossbred sheep, requested veterinary care in July 2017 after noticing neurological signs three days before in a female of the flock.

Biopsies were collected from the third eyelid and rectal mucosa for ante mortem diagnosis due to suspected *Scrapie* 38 sheep over one year old. The animals were

restrained and subjected to a local anesthetic block to obtain the samples. In addition, blood was collected by venipuncture using Vacutainer® tubes containing EDTA. The third eyelid and rectal mucosa fragments were placed in 10% buffered formalin and the whole blood was refrigerated. The samples were sent to the Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), where they were submitted to anti-PrP^{Sc} immunohistochemistry (IHC) examination (LEAL et al., 2012). Euthanasia and necropsy were performed on 14 positive animals, as two died naturally between the collection and euthanasia period, in addition to five lambs from positive mothers.

The 14 sheep over one year old positive in immunohistochemistry plus the 5 five lambs underwent genotyping of the PRNP gene. Genetic polymorphism analysis was performed by determining the allelic frequency of codons 136, 154, and 171 of the prion protein gene (ANDRADE et al., 2011), which allowed classifying the animals according to the degree of susceptibility and resistance to *Scrapie* according to the National *Scrapie* Surveillance Plan table (USDA-APHIS, 2010).

All animals that were euthanized and necropsied (19 sheep) had brain, spinal cord, pharyngeal tonsil, lung, heart, liver, mesenteric lymph node, ileum, kidney and spleen collected in 10% buffered formalin for routine histopathological examination and hematoxylin and eosin (HE) staining. In addition, anti-PrPSc IHC was performed for the brain stem (obex) of all sheep.

RESULTS

The animal was examined, and the suspicion of *Scrapie* was based on the neurological evaluation. Therefore, the property was quarantine by the official state agency, Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina

(CIDASC).

The sheep that developed a neurological condition was an 1-year and 3-month-old female, four months pregnant. The physical examination showed a lean animal that ate and drank water normally, however had difficulty staying in the standing position, incoordination in the pelvic limbs, remaining in sternal recumbency, in addition to pruritus and areas of bilateral alopecia on the lateral face of the thigh (Figure 1A). Another five sheep developed only pruritus and areas of alopecia were also observed on the lateral region of the thorax and bilateral abdomen (Figure 1B). These animals were positive in the test of manually scratching that responded with "nibble" reflex, totaling six animals with these clinical signs.

The 38 evaluated animals ranged in age from one to six years, consisting of 35 females (92.10%) and three males (7.89%). Sixteen sheep (42.10%) were immunostained with anti-PrP^{Sc}, with 14 (87.5%) showing staining in at least three lymphoid follicles of the third eyelid and rectal mucosa and two (12.5%) only on the third eyelid (Figure 2A). The female with neurological signs also showed immunostaining and was euthanized on the 1th day of disease evolution. The outbreak occurred during the calving period and there was no maternity pen. Therefore, several positive animals gave birth, and the others came into contact with the placenta and uterine secretions (Figure 1C).

No significant changes were observed during the macroscopic evaluation, only body condition varying from regular to poor and areas of alopecia in the thoracic and abdominal regions in six (42.85%). Histologically, the only finding was observed in the obex of the female that developed clinical sign, characterized by discrete multifocal vacuolization of the neuropil (Figure 2B).

The anti-PrP^{Sc} IHC of the 19 brain stem (obex) samples collected post-mortem showed that two animals had moderately immunostaining in the cytoplasm of neurons in

the region (Figure 2C), one of them consisting of the female with neurological signal. In addition, these two IHC-positive animals were also found to have ARQ/ARQ and ARQ/VRQ genotypes. These genotypes are associated with mild resistance and high susceptibility to *Scrapie* development, respectively. Table 1 shows the genotypic analyses of PRNP.

DISCUSSION

Sheep and goats older than 12 months of age that present neurological signs for more than 15 days are considered to be animals with clinical suspicion of *Scrapie* (MAPA, 2008). In the present outbreak, the sheep had only three days of neurological signs at the time of clinical evaluation and interdiction of the property, remaining with these signs for 11 days until slaughter. Considering the well-founded clinical suspicion, the property must be quarantine to prevent the entry and exit of sheep and, consequently, prion propagation (MAPA, 2008). One of the hallmarks of the disease that can assist in the diagnosis is the test of manually scratching the back of the animal, which will respond with a “nibbling” reflex. Sheep usually lose weight, present pruritus, and wool loss (MARTINS et al., 2012). Six out of 14 positive animals in the anti-PrP^{Sc} IHC assessment of the three lymphoid follicles of the third eyelid and rectal mucosa for *Scrapie* developed these characteristic signs of pruritus and wool loss. One sheep developed clinical neurological signs such as changes in gait in the pelvic limbs, wool loss, and pruritus and other five sheep showed only pruritus and areas of alopecia. The *Scrapie* incubation period in most cases is higher than one year and cases occur between 2 and 5 years of age (OIE, 2019) and may also be correlated with the amount of PrP^{Sc} deposition and last from 10 days to months (CASSMANN et al., 2019).

The prion is believed to be transmitted horizontally and orally to animals.

Furthermore, the placenta harbors the prion, thus becoming a potential risk of dissemination (HUNTER, 2003). Spread via uterine discharge leads to contamination of the environment where the lamb is more than once in a prolonged period of clinical latency. The age incidence for the development of *Scrapie* is 2 to 4 years, but a minority of cases occur in older sheep (DAWSON et al., 2008). In this outbreak, the contact of the sheep with the placental remains was remarkable due to the absence of maternity pens, thus contributing to the prion propagation and the development of the vast majority of cases in young animals (under 2 years of age).

The ante-mortem diagnosis of *Scrapie* through PrP^{Sc} detection by IHC in lymphoid tissues is considered effective to detect positive sheep, as clinical manifestations may not occur in carrier animals (LEAL et al., 2012). The use of lymphoid tissue from the third eyelid has a high specificity and sensitivity for preclinical tests' (O'ROURKE et al., 2000). However, the suspicion of the disease is not eliminated when the result is negative, making periodic monitoring of suspected animals necessary due to the long incubation period. A wide disease spread was demonstrated in the presented outbreak when the evaluation by anti-PrP^{Sc} IHC was carried out, with almost half of the flock affected, and 87.5% of the positive animals had immunostaining in the lymphoid tissue of the third eyelid and rectal mucosa. An outbreak recorded in the State of Rio Grande do Sul in a flock of 318 sheep showed a positivity of 5.98% for PrP^{Sc} IHC in the third eyelid, with no animals positive in the lymphoid tissue of the rectal mucosa (LEAL et al., 2012).

The studied property had no sanitary control of the purchase and sale of animals nor is the genotyping of the acquired animals requested. The ewes of this outbreak were not separated into paddocks or farrowing pens, and the excretion of the prion in the environment might have occurred through placental remains, which have a large PrP^{Sc}

accumulation, being an important factor to be considered in the spread of *Scrapie* to animals that have high susceptibility (SCHNEIDER et al., 2015).

As described in other outbreaks in Brazil and the world, the disease occurred without an apparent macroscopic lesion. What could be noticed were changes that can be related but are not characteristic, such as the loss of wool and weight (MARTINS et al., 2012; ESTEVES et al., 2021). Histological lesions in classic *Scrapie* are at the brain stem (obex) level and characteristic of vacuolization of neurons and neuropil without inflammatory reaction, as described in this study. However, these lesions have also been described to a lesser extent in the midbrain, pons, medulla oblongata, and lateral and ventral horns of the spinal cord (MARTINS et al., 2012). There is no established pattern in the distribution of atypical *Scrapie* lesions, but lesions in the cortex and cerebellum without changes in the brain stem (obex) have been described (GREENLEE, 2019).

Importantly, only one animal in this outbreak, had characteristic lesions in the brain stem (obex). This intensity is uncommon, as usually the animals have very characteristic and evident neuronal or neuropil vacuolization in the obex in outbreaks, as observed in some studies in Brazil (MARTINS et al., 2012; ANDRADE et al., 2015). Fourteen sheep were positive by the IHC in the lymphoid tissues, however, only two animals that were positive for IHC in the brain stem (obex). In a study carried out in Rio Grande do Sul sheep with immunostaining of the third eyelid did not show immunostaining in the central nervous system or the rectal mucosa and might be considered asymptomatic even with accumulation of PrP^{Sc} in the brain and other tissues (LEAL et al., 2012).

So far 15 haplotypes are known in sheep; the most resistant is the ARR allele whereas the most susceptible is the VRQ allele (USDA-APHIS, 2010). Two out of the 19 animals that underwent genetic analysis presented the ARQ/VRQ genotype, considered

the most susceptible to *Scrapie* development and no animal had the high resistance genotype. This fact must be considered of great importance, as it demonstrates that the genetic selection of these animals does not yet occur in Brazil. In Europe, selection practices by genotyping between 2002 and 2006 have been efficient in eliminating susceptible animals and increasing extremely resistant animals (DAWSON, 2008), which may help in the future to reduce animals with the disease.

The National *Scrapie* Plan for Great Britain is a voluntary program started in 2001 and advocates the eradication of the VRQ allele and encourages positive selection for the ARR allele, while sheep with the VRQ allele are euthanized or castrated (DAWSON et al., 2008).

Dorper sheep are considered highly susceptible to *Scrapie* in the South of Brazil (SOTOMAIOR et al., 2008; IANELLA et al., 2012; ANDRADE et al., 2015). In previous study found the ARQ/ARR genotype to be the second most frequent (ANDRADE et al., 2015), as in the present study. The third most observed genotype was ARQ/VRQ, similar to that found by ANDRADE et al. (2015), however unlike two other studies that observed an occurrence higher than 20% (IANELLA et al., 2012) and 22% (SOTOMAIOR et al., 2008). The ARQ/VRR genotype, considered rare (BARAITAREANU et al., 2013) was observed in 5.26% of the evaluated sheep, similar to that found by ANDRADE et al. (2015) and SOTOMAIOR et al. (2008). The largest number of genotypes were classified between the light and high resistance groups, as well as the data found in other studies with animals of the same breed in Brazil (SOTOMAIOR et al., 2008; ANDRADE et al., 2015).

Genotyping allows identifying resistant animals, which is an extremely important measure to prevent this disease (ALARCON et al., 2021). It also allows the selection of males and females carrying at least one resistant allele and its use in crosses to increase

the frequency of resistance alleles, as recommended by selection programs for genetically resistant animals, considering that they do not transmit the infectious prion (GUBBINS & RODEN, 2006; USDA-APHIS, 2019).

CONCLUSION

In this outbreak had a high number of animals positive for PrP^{Sc}, these sheep when genotyped, were classified in mild resistance to high susceptibility, showing the importance of surveillance of this disease. The clinical picture observed in sheep of the studied property associated with anti-PrP^{Sc} IHC from lymphoid tissue biopsies was effective in confirming the *Scrapie* diagnosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The L.S.Q. was partially funded by the Brazilian Federal Agencies: “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil – Finance Code 001, and by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq), Brazil.

DECLARATION OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

All authors contributed equally for the conception and writing of the manuscript. All authors critically revised the manuscript and approved of the final version.

REFERENCES

- ALARCON, P. et al. A review of cleaning and disinfection guidelines and recommendations following an outbreak of classical *Scrapie*. Preventive Veterinary Medicine, v. 193, p. 1-9, 2021.. Available from: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105388>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105388.
- ANDRADE, C. P. et al. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a *Scrapie*-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. Pesquisa Veterinaria Brasileira, v. 31, n. 10, p. 893–898, 2011. Available from: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/vVYk7C5rrhySWytGSD8RMp/?format=pdf&lang=en>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1590/S0100-736X2011001000010.
- ANDRADE, C. P. et al. Report of outbreaks of classical *Scrapie* in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. Tropical Animal Health and Production, v. 47, n.6, p. 1203–1212, 2015. Available from: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11250-015-0849-9.pdf>>. Accessed: Oct. 10, 2022. doi: 10.1007/s11250-015-0849-9. Epub 2015 May 21. PMID: 25995150.
- ANDREOLETTI, O. et al. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural *Scrapie*. Journal of General Virology, v. 81, n. 12, p. 3115–3126, 2000. Available from: <<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jgv/81/12/0813115a.pdf?Expires=1665063223&id=id&accname=guest&checksum=6C13D57531DE4B60E71ACE76C5046B14>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1099/0022-1317-81-12-3115.
- BARAITAREANU, S. et al. Comparison of the ovine prion protein genotype profiles of breeds Tigaie with Black Head and Merino. Turkish Journal of Veterinary & Animal

Sciences, vol. 37, n. 6, p. 625-630, 2013. Available from: <<https://doi.org/10.3906/vet-1302-50>>. Accessed: Oct. 10, 2022. doi: 10.3906/vet-1302-50.

CASSMANN, E. D. et al. Sheep with the homozygous lysine-171 prion protein genotype are resistant to classical *Scrapie* after experimental oronasal inoculation. *Veterinary Pathology*, v. 56, n. 3, p. 409–417, 2019. Available from: <<https://journals.sagepub.com/doi/epub/10.1177/0300985818817066>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1177/0300985818817066.

DAWSON, M. et al. Progress and limits of PrP gene selection policy. *Veterinary Research*, v. 39, n. 4, p. 1-12, 2008. Available from: <<https://www.vetres.org/articles/vetres/pdf/2008/04/v08061.pdf>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1051/vetres:2007064.

ESTEVES, A. et al. Diagnosis of wasting conditions during meat inspection. v.11, n.11, 2021. Available from: <<https://www.mdpi.com/2076-2615/11/11/3028>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.3390/ani11113028.

FERNANDES., R. et al. ‘*Scrapie*’ em ovinos no Rio Grande do Sul. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v. 6, p. 139–143, 1978. Available from: <<https://www.ufrgs.br/actavet/1-29/1978.pdf>>. Accessed: Oct. 06, 2022.

GREENLEE, J. J. Review: Update on classical and atypical *Scrapie* in sheep and goats. *Veterinary Pathology*, v. 56, n. 1, p. 6–16, 2019. Available from: <<https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/0300985818794247>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1177/0300985818794247.

GUBBINS, S.; RODEN, J. A. Breeding programmes for TSE resistance in British sheep: II. Assessing the impact on the prevalence and incidence of *Scrapie*. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 73, n. 1, p. 17–31, 2006. Available from: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587705001972?via%3Dihub>>.

Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.08.001.

HAMIR, A. N. et al. Experimental transmission of sheep *Scrapie* by intracerebral and oral routes to genetically susceptible Suffolk sheep in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.3–9, 2005. Available from: <<https://journals.sagepub.com/doi/epdf/10.1177/104063870501700103>>. Accessed: Jan. 02, 2023. doi: 10.1177/104063870501700103.

HOUSTON, F. et al. Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and *Scrapie*. PLoS ONE, v.10, n.11, p. 1-17. 2015. Available from: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0143251&type=prntable>>. Accessed: Jan. 02, 2023. doi: 10.1371/journal.pone.0143251.

HUNTER, N. *Scrapie* and experimental BSE in sheep. British Medical Bulletin, v. 66, p. 171–183, 2003. Available from: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14522858/>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1093/bmb/66.1.171.

IANELLA, P. et al. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. Research in Veterinary Science, v. 93, n. 1, p. 219–225, 2012. Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.025>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.06.025.

LEAL, J. S. et al. Utilização de biópsias da terceira pálpebra e mucosa retal em ovinos para diagnóstico de *Scrapie* em uma propriedade da Região Sul do Brasil. Pesquisa Veterinaria Brasileira, v. 32, n. 10, p. 990–994, 2012. Available from: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/Mc4qhkBRYGNkZNZ46rcyV5t/?format=pdf&lang=pt>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1590/S0100-736X2012001000007.

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº 15, de 2 de abril de 2008. Procedimentos para a atuação em casos de suspeita ou ocorrência

de paraplexia enzoótica dos ovinos (*Scrapie*). 2008. p. 1–23. Available from: <http://www3.servicos.ms.gov.br/iagro_ged/pdf/2551_GED.pdf>. Accessed: Oct. 06, 2022.

MARTINS, H. M. et al. *Scrapie* e seu diagnóstico diferencial em ovinos no Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 32, n. 12, p. 1230–1238, 2012. Available from:<<https://www.scielo.br/j/pvb/a/w3Twq7s4QBQHGFHPsgCWx9G/?format=pdf&lang=pt>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1590/S0100-736X2012001200004.

MCMANUS, C. et al. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.39, p. 236-246, 2010. Available from: <<https://www.scielo.br/j/rbz/a/PYxbpSyrMVdv4JXdKG8h7ZJ/?lang=en>>. Accessed: Jan. 02, 2023. Doi: [10.1590/S1516-35982010001300026](https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300026).

O'ROURKE, K. I. et al. Preclinical diagnosis of *Scrapie* by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 9, p. 3254–3259, 2000. Available from: <<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000.

OIE-WAHIS - World organisation for animal health-world animal health information system. Veterinary Services through, 2021. Disponível em: <<https://wahis.oie.int/#/dashboards/qd-dashboard>>. Accessed: Oct. 06, 2022.

OIE - World organisation for animal health. *Scrapie*. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2016. OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. P. 1502–1512, 2018. Disponível em: <https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.07.11_SCRAPIE.pdf>. Accessed: Oct. 06, 2022.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause *Scrapie*. *Science*, v. 216, n. 4542, p. 136–144, 1982. Available from: <

- https://www.science.org/doi/10.1126/science.6801762?url_ver=Z39.88-2003&rfrid=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1126/science.6801762.
- PRUSINER, S. B. Molecular biology of prion diseases. *Science*, v. 252, p. 1515–1522, 1991. Available from: <[https://www.science.org/doi/10.1126/science.1675487#~:text=Infectious%20prion%20particles%20are%20composed,protein%20into%20an%20abnormal%20isoform.](https://www.science.org/doi/10.1126/science.1675487#~:text=Infectious%20prion%20particles%20are%20composed,protein%20into%20an%20abnormal%20isoform.>)>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: [10.1126/science.1675487](https://www.science.org/doi/10.1126/science.1675487).
- SCHNEIDER, D. A. et al. The placenta shed from goats with classical *Scrapie* is infectious to goat kids and lambs. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 8, p. 2464–2469, 2015. Available from: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681073/pdf/vir-96-08-2464.pdf>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1099/vir.0.000151.
- SOTOMAIOR, C. S. et al. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Paraná, Brazil. *Animal Genetics*, v. 39, n. 6, p. 659–661, 2008. Available from: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2052.2008.01775.x>>. Accessed: Oct. 06, 2022. doi: 10.1111/j.1365-2052.2008.01775.x.
- USDA-APHIS - United States department of agriculture. National *Scrapie* surveillance plan, 2010. Available from: <https://www.aphis.usda.gov/vs/nahss/sheep/national_Scrapie_surveillance_plan_0907_2010.pdf>. Accessed: Oct. 06, 2022.
- USDA-APHIS - United States department of agriculture. *Scrapie* program standards Volume 1 : National *Scrapie* eradication program, V. 1, 2019. Available from: <https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/scrapie/downloads/nsep-program-standards-final-rule.pdf>. Accessed: Oct. 06, 2022.



Figure 1. *Scrapie* outbreak in sheep. (A) One-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep in sternal recumbency. The detail shows an area of alopecia on the lateral face of the thigh. (B) Adult crossbred Dorper female sheep with areas of alopecia in the lateral region of the thorax (arrow). (C) Adult Dorper crossbred female sheep positive for *Scrapie* with the placenta and uterine secretions in contact with other sheep.

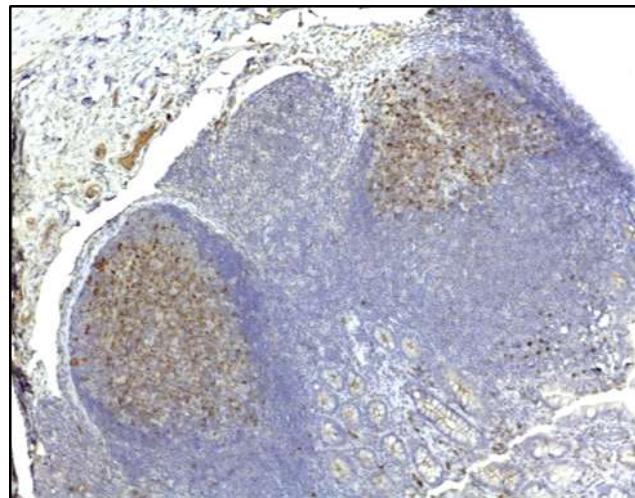


Figure 2. *Scrapie* outbreak in sheep: One-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep. Rectal mucosal biopsy with moderate immunostaining in lymphoid follicles for PrP^{Sc}. Obj. 10.

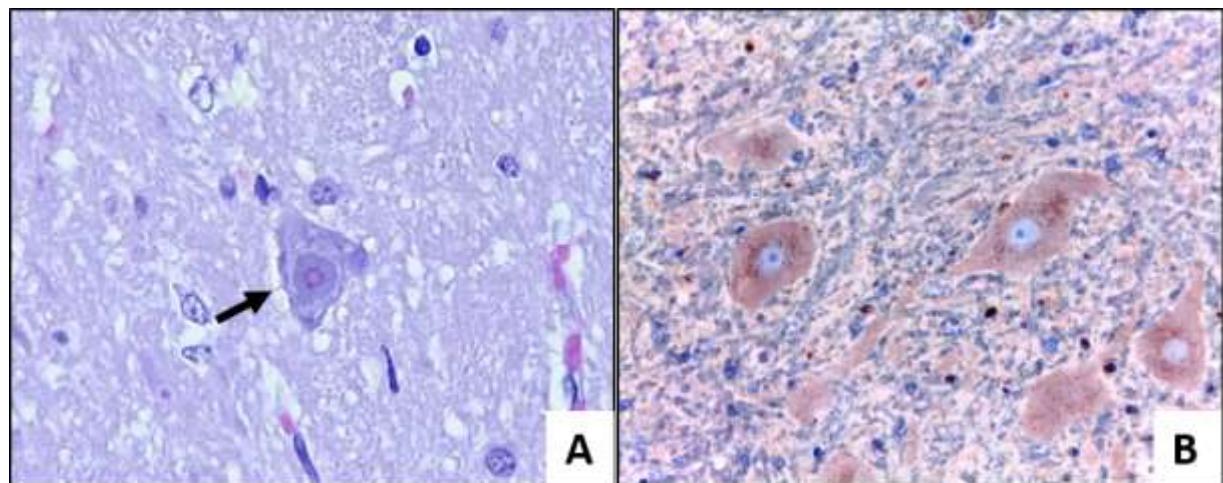


Figure 3. *Scrapie* outbreak in sheep: Brain stem (obex) of one-year and three-month-old crossbred Dorper female sheep. (A) discrete multifocal vacuolization of the neuropil (arrow). HE Obj. 40. (B) moderate immunostaining for PrP^{Sc} in the cytoplasm of neurons and neuropil. Obj. 40.

Table 1. *Scrapie* outbreak in sheep in the state of Santa Catarina. Distribution and classification of PRNP gene genotypes according to the National *Scrapie* Surveillance Plan (USDA), 2010.

Associated <i>Scrapie</i> risk		R1	R2	R3	R4	R5	Total
Genotype	-	ARR/ARQ	ARQ/ARQ	ARQ/VRR	ARQ/VRQ	-	
Number of animals		7	9	1	2	19	
(%)	-	(36.8%)	(47.4%)	(5.3%)	(10.5%)	(100%)	
0-11 m	-	2	3	-	-	5	
12-23 m	-	1	1	-	-	2	
Age	24-35 m	-	2	2	-	1	5
	36-47 m	-	2	1	1	1	5
	> 47 m	-	-	2	-	-	2
Total	0	7	9	1	2	19	

m = months

5 ARTIGO 2

Neste item é apresentado o artigo intitulado “**Atypical clinical Scrapie in a Dorper ram mimicking spinal cord injury.**”

Title: Atypical clinical *Scrapie* in a Dorper ram mimicking spinal cord injury

Running title: ***Scrapie* in sheep mimicking spinal cord injury**

Lucas de Souza **Quevedo**^{1,†}, Joandes H. **Fonteque**^{2,†}, Rubens Peres **Mendes**^{2,†}, Laís

Muniz Arruda **Pereira**^{2,†}, Sara Elis **Schimitt**^{1,†}, Fábio de Carvalho **Ferreira**^{3,†}, Maíra

Daleffe **Innocenti**^{1,†}, Renata A. **Casagrande**^{1,*}

¹ Laboratório de Patologia Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina

(UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), CEP: 88.520-000, Lages, SC,
Brazil

² Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina

(UDESC), Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), CEP: 88.520-000, Lages, Santa
Catarina, Brazil

³Companhia integrada de desenvolvimento agrícola de Santa Catarina (CIDASC),
Florianópolis, SC, Brazil

†Lucas de Souza **Quevedo**, Joandes H. **Fonteque**, Rubens Peres **Mendes**, Laís Muniz
Arruda **Pereira**, Sara Elis **Schimitt**, Fábio de Carvalho **Ferreira** and Maíra Daleffe
Innocenti equally contributed to this work. *Corresponding author: Renata A.
Casagrande

Laboratório de Patologia Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),
Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), CEP: 88.520-000, Lages, SC, Brazil

E-mail: renata.casagrande@udesc.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6845-6344>

***ORCID**

Lucas de Souza **Quevedo**: <https://orcid.org/0000-0002-6269-5798>

Joandes H. **Fonteque**: <https://orcid.org/0000-0003-1194-6048>

Rubens Peres **Mendes**: <https://orcid.org/0000-0003-2658-9442>

Laís Muniz Arruda **Pereira:** <https://orcid.org/0000-0002-6107-9192>

Sara Elis **Schmitt:** <https://orcid.org/0009-0007-8365-5799>

Fábio de Carvalho **Ferreira:** <https://orcid.org/0009-0004-7318-3618>

Maíra Daleffe **Innocenti:** <https://orcid.org/0009-0009-0259-7852>

Renata A. **Casagrande:** <https://orcid.org/0000-0001-6845-6344>

*Author Contributions

Conceptualization: Quevedo LS, Casagrande RA; Data curation: Quevedo LS, Casagrande RA; Formal analysis: Quevedo LS, Casagrande RA; Funding acquisition: Casagrande RA, Fonteque JH, Ferreira FC; Investigation: Quevedo LS, Fonteque JH, Mendes RP, Pereira LMA, Schmitt SE, Ferreira FC, Innocent MD, Casagrande RA; Methodology: Quevedo LS, Fonteque JH, Casagrande RA; Project administration: Quevedo LS, Casagrande RA; Resources: Casagrande RA; Software: Quevedo LS; Supervision: Quevedo LS, Casagrande RA; Validation: Quevedo LS, Casagrande RA; Visualization: Quevedo LS, Casagrande RA; Writi–g - original draft: Quevedo LS, Casagrande RA; Writi–g - review & editing: Quevedo LS, Fonteque JH, Ferreira FC, Casagrande RA

Funding

None.

Conflict of Interest The authors declare no conflicts of interest.

ABSTRACT

Herein, we report an atypical case of scrapie in sheep. A 3-year-old, Dorper ram, presented with kyphosis and difficulty standing still, fasciculations and proprioceptive deficits of the pelvic limbs, and a positive scratch test. In the lymphoid tissue biopsy from the third eyelid and rectal mucosa, enzyme-linked immunosorbent assay was positive for the scrapie isoform of the prion protein (PrPsc). In the medulla at the obex level, there were multiple well-delimited approximately round vacuoles of varying sizes in the perikarya of neurons and their neuronal processes. Immunohistochemical and western

immunoblot analyses were positive, and the genotype of the ram was naturally susceptible (ARQ/ARQ).

KEYWORDS: Nervous system, transmissible spongiform encephalopathies, prion diseases, genotypin small ruminants, sheep

INTRODUCTION

Scrapie is an infectious disease of sheep and goats characterized by paresis, pruritus, and locomotor disorders [1]. The disease belongs to a group of diseases called transmissible spongiform encephalopathies [2]. It is estimated that in the United States alone, the disease represents losses of between \$10 and \$ 20 million per year due to the suspension of exports of products derived from sheep, matrices, semen, and embryos, in addition to expenses related to carcass disposal and increased production costs [3].

Unaltered cellular prion protein (PrP^c) modulates nervous and immune system functions, such as cell proliferation, differentiation, and sensitivity to apoptosis [4]. When the PrP^c changes its conformation, it accumulates inside neurons, called scrapie isoform of the prion protein (PrP^{sc}), and disseminates into the central nervous system [4,5]. This study aimed to report the clinicopathological aspects and genotypic characteristics of an isolated case of scrapie in a ram with atypical clinical signs in Brazil.

CASE PRESENTATION

A 3-year-old Dorper sheep developed clinical signs of muscle tremors, difficulty in locomotion, a dog-sitting posture, and difficulty standing for 30 days. The sheep were acquired approximately 40 days prior and remained in a paddock with some bulls, but no conflict was observed between them. Sheep ingested food and water normally, and their diet was based on feed composed of corn grain, soybean hulls, Tifton hay, and gigs. The animals remained on the Tangola pasture during the day and were kept on a sheepfold at night.

Physical examination showed a body condition of 2.5 (1–5), a rectal temperature of 38.6 °C, a respiratory rate of 96 movements per minute, 36 beats per minute, normokinetic pulse, and four ruminal movements every 5 min (rumen hypomotility). Kyphosis attracted the most attention in the neurological examination (Figure 4A), in addition to preferential sternal recumbency and difficulty in standing. The animal presented the dog sitting posture and fell in an attempt to remain in the standing position (Figure 4B). Proprioceptive deficit, reduction of deep pain, and absence of superficial pain, spasticity, and muscle fasciculations were observed in the pelvic limbs. The scratch test showed a positive pruritus reflex, characterized by licking the lips satisfactorily. The “scratch” test consists of manually scratching the animal’s back, which will respond with a “nibble” reflex [1]. Radiographic and myelographic examinations revealed no significant abnormalities. There were no changes in the blood count, total plasma protein, or plasma

fibrinogen levels. Creatine phosphokinase enzymatic activity was increased. A lymphoid tissue biopsy from the third eyelid and rectal mucosa was performed and referred for PrP^{sc} screening using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with both samples being positive. The ram was euthanized due to an unfavorable prognosis. All organs were collected and fixed in 10% buffered formalin for routine histopathological processing and hematoxylin and eosin. The spinal cord, medulla at the obex, pharyngeal tonsils, mesenteric lymph nodes, ileum, and spleen were positive for anti-PrP^{sc} on immunohistochemical evaluation. Moreover, medulla at the obex and spinal cord samples were considered characteristic of classic scrapie using western immunoblot analysis. Prion protein (PRNP) genotyping was performed using genomic DNA extracted from frozen brains, and polymorphisms in codons 136, 154, and 171 of the PRNP were examined using real-time polymerase chain reaction.

A necropsy revealed no macroscopic changes. Histopathological examination revealed multiple well-delimited moderately round vacuoles of varying sizes in the pericaries of the neurons and neuropils (Figure 5). Multifocal vacuolization was observed in the frontal lobe at the corpus callosum and basal ganglia level, ranging from moderate to mild in the neuropil. The diencephalon, encompassing the parietal cortex, hippocampus, and thalamus, showed moderate multifocal vacuolization of the neuropil, discrete vacuolization of the gray matter, and rare neurons with cytoplasmic vacuolization. The midbrain at the level of the rostral colliculi showed moderate multifocal vacuolization in the white matter, discrete vacuolization in the neuropil, and rare neurons with cytoplasmic vacuolization. The occipital cortex was the only region of the central nervous system that showed no alterations. The pons showed discrete multifocal vacuolization in the white matter neuropil and rare neurons with cytoplasmic vacuolization. The cerebellum showed moderate multifocal vacuolization in the white matter and mild vacuolization in the Purkinje neurons with cytoplasmic vacuolization. The spinal cord in the region of thoracic and lumbar swelling showed discrete multifocal vacuolization in the white and gray matter neuropils. Neurons of the trigeminal ganglion were also evaluated, and discrete multifocal vacuolization of the cytoplasm was observed.

The genotype was classified as naturally susceptible (ARQ/ARQ) to disease development and group 3 of light resistance according to the National scrapie Surveillance Plan.

DISCUSSION

Purebred, white Dorper sheep and their crossbreeds are considered more predisposed to the development of scrapie [6]. The breed of the ram in this study is an essential epidemiological factor in scrapie cases, as well as age, because in sheep that develop neurological clinical signs are between 2 and 5 years of age [7]. This is the second diagnosis in an animal of the Dorper breed in Brazil and the first in Santa Catarina.

The clinical diagnosis of the ram was initially attributed to thoracolumbar spinal cord trauma between T3 and L3 due to the dog's sitting posture, but it was discarded when evaluated by radiography and myelography. Despite this, scrapie had not yet been considered owing to neurological clinical signs not specific to the disease, characterized by wool loss and head tremors [6]. The only neurological signs that could lead to suspicion of *scrapie* are limb weakness and sternal recumbency, as animals usually develop ataxia and fasciculations of the pelvic limbs [7]. A positive scratch test and unfavorable diagnosis justified euthanasia, allowing complementary examinations and confirming the diagnosis of scrapie [1,6]. Cases of atypical scrapie, stiff gait, ataxia, hypermetria (dysmetria), abnormal pelvic limb posture, generalized tremors, and lip tremors have been reported. [8]. In an experimental study, animals with greater accumulation of PrP^{sc} in the cerebellum with the ARQ/ARR genotype developed severe dysmetria [8].

At necropsy, no alterations are observed in the cases of scrapie, as observed in the ram in this report. However, some indications may help in the suspicion and diagnosis of the disease, such as poor body condition and extensive hairless areas [1].

On microscopic evaluation, lesions in the medulla are commonly reported and are characterized by well-delimited round vacuoles of different diameters in the perikaryon of neurons and distributed throughout the neuropil, mainly in the medulla at obex level[1,9]. In this case, the lesion was also observed in this region at moderate intensity in the white matter and discrete gray matter in the parietal cortex, hippocampus, and thalamus. However, it can also occur to a lesser extent in classic cases in the mesencephalon, pons, medulla oblongata, lateral and ventral horns of the medulla, dorsal motor nucleus of the vagus nerve, cerebellum, and cortex [1,9]. In the present case, these same regions had a lower intensity of vacuolization, similar to those described in other cases. However, the lesions were of moderate intensity in the white matter and discrete in the Purkinje neuron cerebellum, commonly described in cases of atypical scrapie [8].

The definitive diagnosis in this sheep was obtained through histopathology and

immunohistochemistry of samples of the spinal cord, medulla, mesenteric lymph nodes, spleen, and tonsils [6]. ELISA is usually performed for screening when there is a clinical suspicion of *Scrapie* [10], as in this case. scrapie should be considered a differential diagnosis when sheep develop atypical signs, such as kyphosis, or acquire a dog-sitting position.

Genotyping is important in sheep flocks for selecting genetically resistant animals, as in Europe, where selection programs are performed to eliminate sheep with high susceptibility [11]. In Brazil, the ARQ/ARQ genotype, the same as that observed in the animal in this study, is the most common in sheep [6] and is classified as moderate risk (R3) for the development of scrapie according to the United States Department of Agriculture [12,13]. In Brazil, the occurrence of scrapie has been considered recently, and genotyping, considered one of the methods for describing and correctly controlling the disease, is rarely performed [14,15].

This report describes a case of scrapie in a sheep with atypical clinical signs of the disease, indicating that when animals show neurological signs, such as kyphosis and proprioceptive deficits of the pelvic limbs, scrapie should always be considered a differential diagnosis. This genotype was classified as naturally susceptible (ARQ/ARQ) to disease development, demonstrating the importance of early diagnosis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC).

REFERENCE

1. Martins HM, Carvalho NM, Ribas NL, Driemeier D, Lemos RA, Guimarães EB. *Scrapie* and differential diagnosis in sheep in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz. J. Res. Vet.* 2012;32(12):1230-1238.
2. Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*. 2005;10;64(9):1586-91.
3. United States Department of Agriculture - Animal and Plant Health Inspection Service. National *Scrapie* Surveillance Plan. [Internet]. USA: USDA:APHIS/NPSP

https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/scrapie/downloads/national_scrapie_surv_plan.pdf

Updated 2022. Accessed 2023 Apr 14.

4. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;10;95(23):13363-83.
5. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of t53rionion protein. PhysiverRev. 2008;88(2):673-728.
6. Andrade CP, de Oliveira EC, Leal JS, de Almeida LL, de Castro LA, da Silva SC, et al. Report of outbreaks of classical *Scrapie* in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. Trop Anim Health Prod. 2015;47(6):1203-12.
7. Moore SJ, Smith JD, Greenlee MH, Nicholson EM, Richt JA, Greenlee JJ. Comparison of two US sheep *Scrapie* isolates supports identification as separate strains. Vet Pathol. 2016;53(6):1187-1196.
8. Cassmann ED, Mammadova N, Moore SJ, Benestad S, Greenlee JJ. Transmission of the atypical/Nor98 *Scrapie* agent to Suffolk sheep with VRQ/ARQ, ARQ/ARQ, and ARQ/ARR genotypes. PLoS One. 2021;11;16(2):e0246503.
9. Greenlee JJ. Review: update on classical and atypical *Scrapie* in sheep and goats. Vet Pathol. 2019;56(1):6-16.
10. Esteves A, Vieira-Pinto M, Quintas H, Orge L, Gama A, Alves A, et al. *Scrapie* at abattoir: monitoring, control, and differential diagnosis of wasting conditions during meat inspection. Animals (Basel). 2021; 21;11(11):3028.
11. Ortiz-Pelaez A, Thompson CE, Dawson M. The impact of the National *Scrapie* Plan on the PRNP genotype distribution of the British national flock, 2002-2012. Vet Rec. 2014; 24;174(21):530.

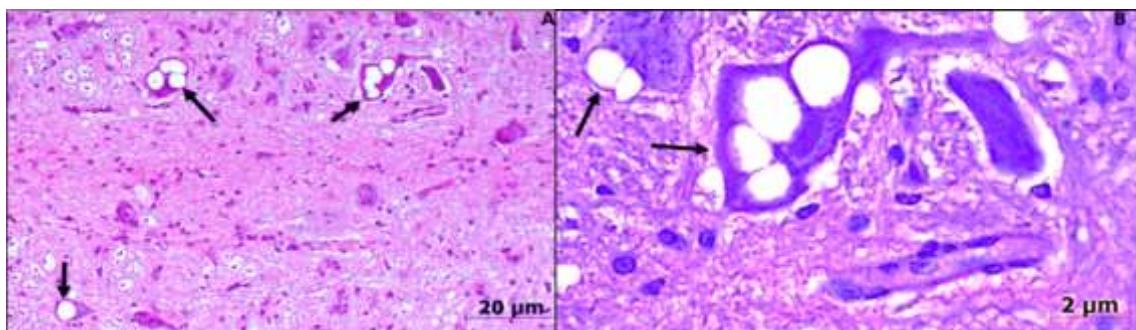
12. Sotomaior CS, Sotomaior VS, Madeira HM, Thomaz-Soccol V. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Paraná, Brazil. Anim Genet. 2008; 39(6):659-61.
13. Ianella P, McManus CM, Caetano AR, Paiva SR. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: issues for conservation and breeding programs. Res Vet Sci. 2012; 93(1):219-25.
14. Andrade CP, Almeida LL, Castro LA, Leal JS, Silva SC, Driemeier D. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a *Scrapie*-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. Bra J. Vet. Res. 2011; 31(10):893-898.
15. Santos CR, Mori E, Leão DA, Maiorka PC. Genotyping of polymorphisms in the PRNP gene in Santa Ines sheep in the State of São Paulo, Brazil. . Bra J. Vet. Res. 2012; 32(3):221-226.

FIGURE LEGEND

Fig. 4. A 3-year-old male Dorper ram with an atypical case of *Scrapie*.
 A: Dog sitting posture and kyphosis. B: Dorsal recumbency after a fall in an attempt to remain in a standing position.



Fig. 5. Atypical case of scrapie 3-year-old Dorper ram A: Medulla at the obex level: multiple neurons with well-delimited round vacuoles of varying sizes (arrows); H&E stain; bar = 20 μ m. B: Higher magnification of A; H&E stain; bar = 2 μ m. .H&E, hematoxylin and eosin.



6 ARTIGO 3

Neste item é apresentado o artigo intitulado “***Scrapie* em ovinos: associação do grau de vacuolização encefálica com os sinais clínicos neurológicos.**”

6 SCRAPIE EM OVINOS: ASSOCIAÇÃO DO GRAU DE VACUOLIZAÇÃO ENCEFÁLICA COM OS SINAIS CLÍNICOS NEUROLÓGICOS

RESUMO

Scrapie é uma doença de ovinos que cursa com quadro neurológico, possui caráter infeccioso e ao entrar em contato com a forma normal da proteína prón (PrP), realiza a conversão em proteína que possui isoforma anormal (PrP^{Sc}) levando a deposição no sistema nervoso central. Este estudo tem como objetivo associar o quadro clínico com a mensuração das alterações vacuolares observadas em diferentes regiões do encéfalo de ovinos diagnosticados com *scrapie*. Foram avaliados um caso isolado (caso 1) de um carneiro e dois ovinos (casos 2 e 3) de outro rebanho. O carneiro (caso 1) apresentou decúbito esternal com postura de cão sentado, fasciculações dos membros pélvicos, cifose, déficit proprioceptivos dos membros pélvicos, redução da dor profunda e superficial e foi positivo no “teste de Scratch”. O carneiro (caso 2) apresentou prurido, perda de lã no lado direito nas regiões torácica e lombar dorsal, escapular e umeral, além da cervical, tremores discretos de cabeça e o teste de Scratch foi negativo. Na ovelha (caso 3) observou-se apenas prurido na face e alopecia na região dos ossos nasal, frontal e parietal. Os três ovinos foram positivos na imuno-histoquímica ou ELISA anti- PrP^{Sc} na biópsia de tecido linfoide da terceira pálpebra e/ou mucosa retal e foram submetidos a eutanásia. Na genotipagem do gene PRNP, o ovino 1 foi classificado como de baixa resistência (R3), o ovino 2 de alta suscetibilidade (R5) e o ovino 3 resistente (R2). Os locais em que houve maior média de vacúolos em neurópilo foram nos ovinos 1 e 3 no tálamo e no ovino 2 na medula espinhal. Já em neurônios a maior média foi observada em tálamo, colículos rostrais e córtex frontal nos ovinos 1, 2 e 3, respectivamente. Os achados histológicos observados neste estudo demonstram que o grau de vacuolização pode influenciar na gravidade quadro neurológico dos ovinos, entretanto nem sempre o animal desenvolve sinais clínicos. Provavelmente o desenvolvimento dos sinais clínicos dos animais infectados pelo prón, irá depender do genótipo do ovino, quantidade de prón e local de deposição no sistema nervoso central.

Palavras-chave: vacuolização neuronal, encefalopatia espongiforme, ovino

6.1 INTRODUÇÃO

Scrapie é uma enfermidade que acomete os ovinos e pertence ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET). Possui como característica a deposição de uma forma alterada da proteína priônica (PrP^{Sc}) no tecido encefálico que evolui para doença neurológica e morte (PRUSINER, 1998). Os príons são proteínas que possuem caráter infeccioso que ao entrar em contato com a forma normal da proteína príon (PrP^{C}), realizam a conversão em uma isoforma anormal (PrP^{Sc}) (PRUSINER, 1998).

Após o ovino entrar em contato com príon seja por ingestão, inalação ou contato direto pelas membranas mucosas ou conjuntivas, ocorre a adesão às superfícies apicais das células epiteliais da mucosa, das Células M, além de células dendríticas das mucosas das tonsilas, do trato digestivo e respiratório (LINDEN et al. 2008). Posteriormente, a PrP^{Sc} é fagocitada por células apresentadoras de抗ígenos como macrófagos e células dendríticas. Estas células fazem a entrega do príon nos centros germinativos das placas de Peyer e em outros tecidos linfoideos (COBB & SUREWICZ, 2009). No sistema nervoso periférico (SNP) o príon consegue sair dos tecidos linfoideos e ganhar o sistema nervoso central (SNC), além disso o baço ainda pode atuar como reservatório do príon (GLATZEL et al., 2001). Suspeita-se que o agente também possa se disseminar por via hematogênica (DONALDSON et al., 2012; GONZÁLEZ et al., 2014).

Ao identificar quais células e moléculas estão envolvidas no transporte transepitelial do príon é possível estabelecer processos que influenciam na suscetibilidade à enfermidade, a partir disso, métodos de intervenções podem ser desenvolvidos (DONALDSON et al., 2012). Variações nas alterações encefálicas, como envolvimento de substância cinzenta ou substância cinzenta e branca, acúmulos intracelulares ou extracelulares, maior ou menor envolvimento de células gliais, podem ser observadas. Estes acúmulos que dão origem a esta diversidade de fenótipos neuropatológicos (GONZÁLEZ et al., 2014). Sugere-se que estes padrões de lesões sejam alterados devido ao polimorfismo do gene PrP^{C} do hospedeiro ou pela cepa do príon, ou seja, a interação entre o príon e o hospedeiro (BECK et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2010).

Macroscopicamente não são observadas alterações, entretanto, alguns indícios podem auxiliar na suspeita e no diagnóstico da doença, como estado corporal ruim e extensas áreas deslanadas (MARTINS et al., 2012). Na avaliação histopatológica as lesões são caracterizadas por vacúolos redondos, bem delimitados e de diferentes diâmetros no pericálio de neurônios e distribuídos pelo neurópilo principalmente na região de medula na altura de óbex, entretanto, também podem ocorrer no mesencéfalo, ponte, medula oblonga, cornos laterais e ventrais da medula, núcleo motor dorsal do nervo vago, já no cerebelo e córtex pode ser observada alteração espongiforme leve (MARTINS et al., 2012; GREENLEE et al., 2019).

Uma forma atípica Nor98 é descrita, na qual as lesões também são vacuolares principalmente no neurópilo, e alguns vacúolos intraneurais. A principal diferença é alteração espongiforme das camadas molecular e granular em cerebelo (GREENLEE et al., 2019). A vacuolização do neurópilo geralmente ocorre na camada molecular do cerebelo e no córtex cerebral, em menor grau pode observar-se no tronco cerebral, entretanto, não há alterações vacuolares na medula na altura de óbex (BENESTAD et al., 2003). Os quadros de *scrapie* levam a morte neuronal sucessiva, crônica e não há processo inflamatório envolvido (KIMBERLIN, 1990).

O presente trabalho tem como objetivo associar o quadro clínico neurológico com a mensuração das alterações vacuolares observadas em diferentes regiões do encéfalo de ovinos diagnosticados com *scrapie*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Caso 1

Um ovino macho de três anos da raça Dorper (ovino 1) foi encaminhado ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). O carneiro era proveniente de uma propriedade localizada no município de Pouso Redondo, Santa Catarina e havia sido adquirido há aproximadamente quatro meses antes do início dos sinais clínicos. O animal foi encaminhado para o atendimento devido ao quadro neurológico com evolução de aproximadamente 40 dias.

No HCV do CAV/UDESC o animal passou por exame físico, neurológico, radiografia e mielograma. Em decorrência ao quadro neurológico observado havia suspeita de lesão traumática entre segunda e terceira vértebras torácicas.

O ovino foi submetido a biópsia de tecido linfoide, as quais foram remetidas ao Laboratório Federal de Defesa de Pernambuco (LFDA-PE) para realização de imuno-histoquímica. Foi optado pela eutanásia devido o prognóstico desfavorável e a piora dos sinais neurológicos. Fragmentos de medula espinhal, óbex, tonsila, linfonodo mesentérico, íleo e baço foram remetidos refrigerados para *Canadian Food Inspection Agency* localizado no Canadá para exame de imuno-histoquímica e *Western Immunoblot*.

A genotipagem do gene PRNP foi obtida por meio do DNA genômico que foi extraído do cérebro congelado e os polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene da proteína prón (PRPN) foram examinados por PCR em tempo real.

Caso 2

Em julho de 2021 a CIDASC, contactou o Laboratório de Patologia Animal da UDESC devido à suspeita clínica de *scrapie*. Primeiramente foi realizado inquérito epidemiológico e exame *ante mortem* de um ovino macho mestiço, Dorper, de dois anos (ovino 2), com sinal neurológico. O ovino havia sido adquirido há aproximadamente um ano.

O animal passou por coleta de sangue total para análise molecular e genotipagem, e em seguida foi submetido a eutanásia devido ao prognóstico clínico desfavorável. As amostras de óbex, íleo, tecido linfoide de terceira pálpebra e mucosa retal foram colhidas e mantidas resfriadas para confirmação do diagnóstico de *scrapie* junto ao LFDA-PE pelas técnicas de imuno-histoquímica ou ensaio de imunomarcação enzimática anti-PrP^{Sc}. Neste mesmo dia outros três animais na propriedade (ovinos 3, 4 e 5) foram submetidos a biópsia de terceira pálpebra e mucosa retal para envio das amostras juntamente com a amostras do ovino 2.

Biópsias de tecido linfoide e de terceira pálpebra e mucosa retal

Para colheita das biópsias foi realizada a contenção física dos animais. Na colheita da terceira pálpebra foi aplicado colírio oftalmológico (Colírio anestésico, cloridrato de tetracaína 1% e cloridrato de fenilefrina 0,1%,

Laboratório Allergan, Brasil) no olho esquerdo. A mucosa palpebral foi pinçada e levemente tracionada para afastamento do conjuntivo adjacente, com a tesoura de Metzenbaum e um corte para coleta da amostra do tecido linfoide da terceira pálpebra. Para a colheita da mucosa retal foi utilizado um conjunto de pinça e tesoura curva, esta amostra que foi retirada a 2 cm cranial da linha da junção da mucosa reto-anal, na região ventral. Para realizar este procedimento foi realizada a aplicação de 0,5 mL de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor (Xylestesin®, Laboratório Cristália, Brasil) na mucosa retal, este procedimento teve auxílio de um espéculo ginecológico de tamanho médio humano vagispec® introduzido no reto do animal. Após o procedimento foi aplicado repelente, cicatrizantea aerossol (Bactrovet Prata AM®, Laboratório König do Brasil) (LEAL et al., 2012).

Imuno-histoquímica ou ensaio de imunoabsorção enzimática anti-PrP^{Sc}

Os tecidos linfoides foram acondicionados em formalina a 10% para realização da imuno-histoquímica (IHQ) anti-PrP^{Sc} ou congelados para realização de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) anti-PrP^{Sc} (LEAL et al., 2012; MELONI et al., 2012). O material colhido foi remetido ao LFDA-PE (BRASIL, 2018).

Análise molecular e genotipagem

Foi colhido sangue total dos ovinos do presente estudo, para a realização da análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) para classificar os ovinos quanto ao grau de suscetibilidade e resistência à *scrapie* de acordo com *National Scrapie Surveillance Plan* (USDA), 2010. O sangue de três ovinos (casos 1, 2 e 3) foi colhido por meio de punção da veia jugular com a utilização de tubos Vacutainer® contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), mantidas a -20°C até a realização das análises moleculares. A extração de DNA foi executada individualmente através do kit *GeneElute™ Blood Genomix DNA* (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) de acordo com as orientações do fabricante. As amostras foram mensuradas em espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

A PCR foi conduzida utilizando o par de primers 136 (5'-ATGAAGCATGTGGCAGGAGC-3') e 171 (5'-

GGTGACTGTGTGTTGCTTGAUTG-3') que abrange as regiões dos três códons principais descritos para resistência ou suscetibilidade ao prón, 136, 154 e 171 (ANDRADE et al., 2011), amplificando um fragmento de 245 pares de base. A reação de 25uL foi composta por 1uL de DNA, 15pmol de cada primer, 1.5mM de MgCl₂, 200uM de dNTPs, 1X de tampão de reação e 1U de Taq DNA Polimerase (*Kit GoTaq G2 Hot Start Polymerase* – Promega Corporation®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), além de água ultrapura autoclavada para completar o volume. A reação foi conduzida em um termociclador *ABI Veriti* (Applied Biosystems®, Foster City, California, Estados Unidos) utilizando as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C a 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 10 minutos. As amostras amplificadas foram purificadas manualmente utilizando 2,5uL de acetato de sódio 3M e 100uL de etanol 100%. As reações purificadas foram novamente quantificadas em espectrofotômetro *Nano Drop 2000* (Thermo Scientific®, Wilmington, Delaware, Estados Unidos).

As sequências de cada amostra foram obtidas através de sequenciamento Sanger, utilizando o kit *BigDye Terminatior 3.1 Cycle Sequencing* em um *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®, Foster City, California, Estados Unidos). Cada amostra foi sequenciada uma vez nos sentidos *forward* e *reverse*. As sequências foram avaliadas através do *BioEdit 7.2 Software* (HALL, 1999), editadas e concatenadas. Em seguida, foram alinhadas através do método *ClustalW* (Thompson et al., 1994) no software *MEGA11* (TAMURA et al., 2021). As sequências deste estudo foram alinhadas com uma sequência completa para referência depositada na plataforma BLAST, GenBank “*Ovis aries* PrP mRNA for prón protein ARQ complete cds” (número de acesso AB621927) para obtenção dos aminoácidos presentes nas posições 136, 154 e 171 do gene. Para a genotipagem e classificação da susceptibilidade destes ovinos à *scrapie*, foi averiguada a frequência alélica dos códons 136, 154 e 171 para posterior tabulação e classificação dos genótipos de acordo com Roels et al. (2004).

Mensuração da vacuolização no sistema nervoso central de ovinos com *scrapie*

Após a fixação do encéfalo em formalina tamponada a 10% foram realizados sete cortes seriados transversais do cérebro e um longitudinal do cerebelo (Ovinos 1, 2 e 3) com diagnóstico positivo para PrP^{Sc} por IHQ e/ou ELISA de biópsia de tecido linfoide de terceira pálpebra e/ou mucosa retal. Em seguida, os cortes de ambos os hemisférios foram emblocados em parafina e corados com eosina e hematoxilina (HE).

Os oito cortes foram: 1: Lobo frontal na altura do joelho do corpo caloso - córtex frontal e dos núcleos da base. 2: Diencéfalo através da aderência intertalâmica - córtex parietal, hipocampo e tálamo. 3: Córtex occipital. 4: Cerebelo. 5: Mesencéfalo - colículos rostrais. 6: Ponte com pedúnculos cerebelares. 7: Bulbo na altura do óbex. 8: Medula espinhal cervical, conforme estão representados na Figura 6.

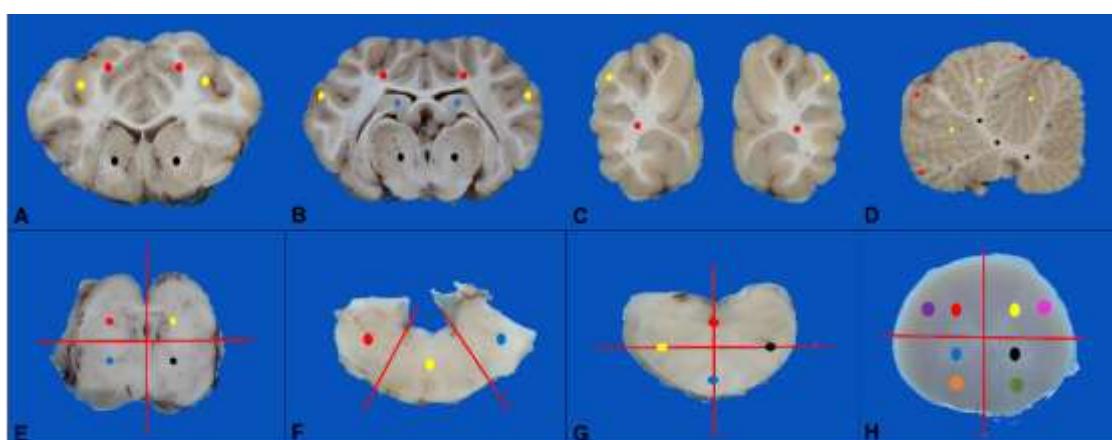


Figura 6: Cortes transversais e longitudinal de encéfalo fixados em formalina a 10% de ovinos com scrapie. Os pontos representam as áreas microscópicas avaliadas para mensuração de vacúolos. **A** - Corte transversal do lobo frontal: córtex frontal em amarelo substância cinzenta, em vermelho a sustância branca. Núcleos da base em preto. **B** - Corte transversal de diencéfalo: lobo parietal em amarelo substância cinzenta, em vermelho a sustância branca. Hipocampo: azul. Tálamo: preto. **C** - Corte transversal de córtex occipital em amarelo substância cinzenta, em vermelho a sustância branca. **D** - Corte longitudinal de cerebelo em amarelo camada granular, em vermelho camada molecular, em azul, células de Purkinge e em preto substância branca. **E** - Corte transversal de colículos rostrais foram avaliados área 1 em vermelho, 2 em amarelo, 3 em azul e 4 em preto. **F** - Corte transversal de ponte com pedúnculos cerebelares área 1 em vermelho, 2 em amarelo e 3 em azul-. **G** - Corte transversal de bulbo à altura do óbex, área 1 em vermelho, 2 em amarelo, 3 em azul e 4 em preto foram avaliadas. **H** - Corte transversal de medula espinhal, vermelho e amarelo são os cornos dorsais e azul e preto cornos ventrais e substância branca lilás, rosa, laranja e verde.

Análise dos vacuolização

Foi realizado a mensuração histológica do número de vacúolos em cada região. Os vacúolos foram contados em microscópio Zeiss Axio Scope.A1 (AxioCam ICc, software AxioVision 4.8.1 11-2009) em objetiva de 40 contando 3-4 regiões de forma aleatória e assim, obtendo-se a média. Quando a vacuolização foi observada no neurônio o mesmo era marcado com um X da cor vermelha e quando observada em neurópilo foram sinalizados em X preto na coloração de eosina e hematoxilina. O grau de vacuolização foi avaliado de forma descritiva de 0 a 3, quando não houve vacuolização foi atribuído grau 0, grau 1 (discreta) de 1 a 5 vacúolos, grau 2 (moderada) de 6 a 10, grau 3 (acentuada) mais que 11 vacúolos na objetiva de 40 e após a realização das médias de cada região contada.

Uma segunda classificação foi realizada conforme o número de regiões afetadas. Quando observado vacuolização em 1 a 2 regiões era considerada do tipo I, tipo II de 3 a 5, tipo III acima de 5 regiões. Nesta classificação separou-se vacuolização em neurônios e vacuolização em neurópilo. Todas essas avaliações de grau de vacuolização foram realizadas a partir de adaptações de Mould et al. (1967).

6.3 RESULTADOS

Caso 1

O carneiro (ovino 1), estava decúbito lateral (Figura 7) e esternal com postura de cão sentado, fasciculações dos membros pélvicos, cifose, déficit proprioceptivos dos membros pélvicos, redução da dor profunda e superficial e foi positivo no teste de “scratch”.

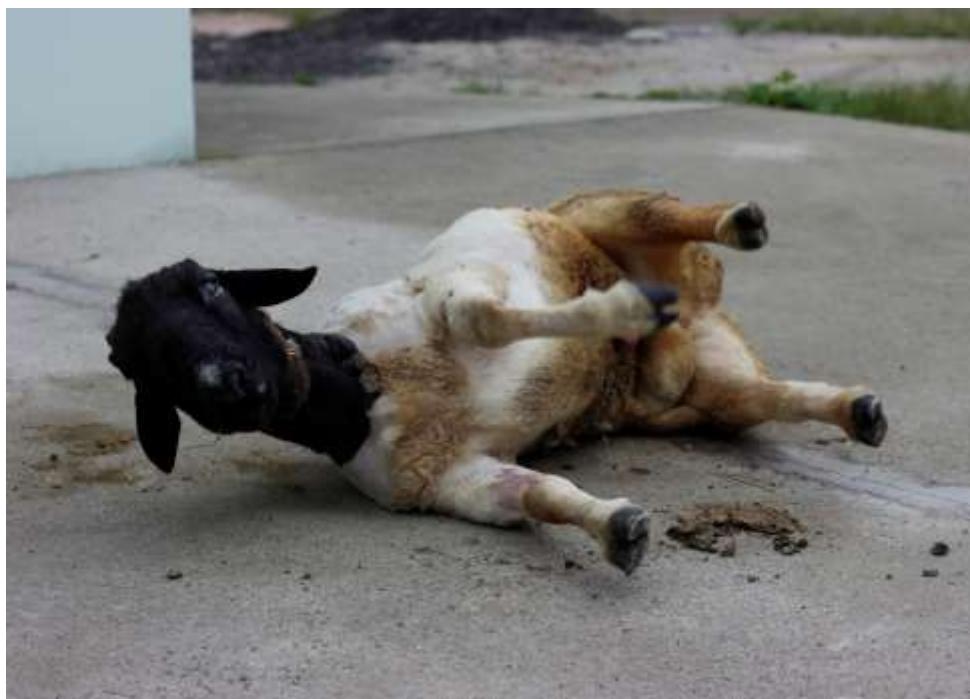


Figura 7: Ovino, macho, Dorper, três anos com *Scrapie* em decúbito lateral direito.

Caso 2

Na propriedade havia quatro ovinos, um macho e uma fêmea e suas crias, dois machos com menos de um ano em 2021 (nascido em épocas diferentes). O local de parição da ovelha era no mesmo local onde encontrava-se os demais animais, não havia destinação dos restos placentários.

O animal que desenvolveu sinais clínicos era um ovino macho mestiço Dorper de 2 anos de idade (Figura 8A). Ao chegar ao local o proprietário relatou que o carneiro iniciou com coceira em cercas, objetos e árvores há dois meses antes do acompanhamento e evoluiu para tremor no mês anterior ao atendimento.

Na avaliação neurológica constatou-se tremores discretos de cabeça, perda de lã moderada na região das escápulas e no teste de Scratch foi negativo. Na necropsia observou-se que o ovino estava em bom estado corporal, com múltiplas áreas de perda de lã no lado direito nas regiões torácica e lombar dorsal, escapular e umeral, além da cervical.

Em fevereiro de 2022 retornou-se a propriedade após a confirmação do diagnóstico de *Scrapie* (biópsias de tecido linfoide de mucosa retal e de terceira pálpebra no teste de ELISA e IHQ anti-PrP^{Sc} – primeira visita), para a realização

da eutanásia e necropsia da ovelha (ovino 3), os ovinos 4 e 5 foram negativos no mesmo teste.

O ovino 3 era uma fêmea, mestiço Dorper com Santa Inês, 3 anos e seis meses em estado corporal regular. O animal apresentou prurido com alopecia e deposição de crostosas na região dos ossos nasal, frontal e parietal (Figura 8B).



Figura 8: A – Ovino, macho, mestiço Dorper, 2 anos com *Scrapie*. Nas setas indicam múltiplas áreas de perda de lã devido o prurido intenso nas regiões torácica e lombar dorsal, escapular e umeral, além da cervical. B - Ovino, fêmea, mestiço Dorper com Santa Inês, 3 anos e seis meses com *Scrapie*: pele da região periocular abrangendo os ossos região dos ossos nasal, frontal e parietal com alopecia e deposição de crostas focalmente extensa.

Os ovinos que tiveram sinais clínicos mais graves foram os que tiveram alterações vacuolar principalmente em medula espinhal, colículos rostrais e óbex conforme pode ser observado na Tabela 2 e demonstrado na Figura 9. Na Tabela 3 estão demonstrados os sinais clínicos e os genótipos com grau de suscetibilidade. Todos os animais tiveram vacuolização em mais de cinco regiões sendo classificados como tipo III (Figura 10).

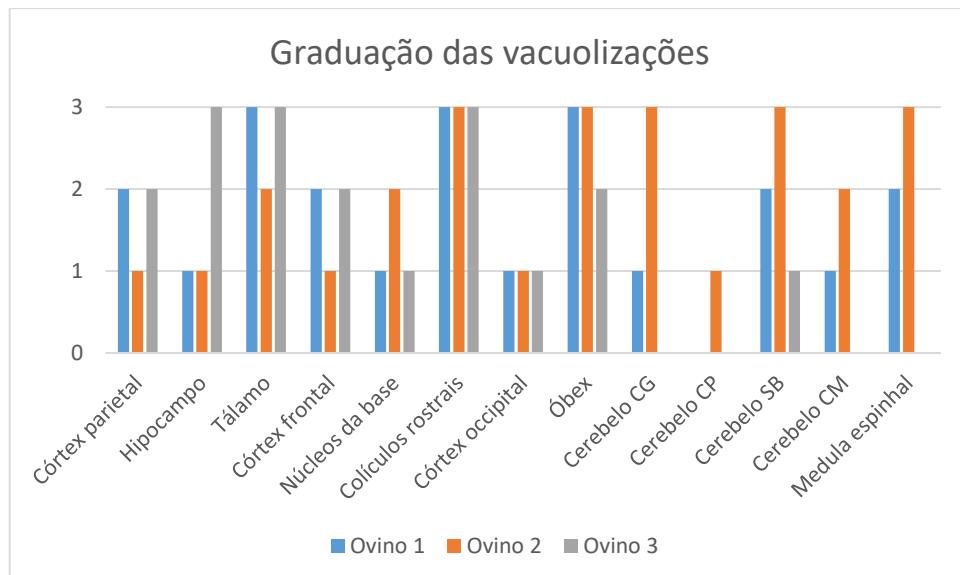


Figura 9 – Escore de graduação das médias de vacuolização por região de ovinos com *Scrapie*. 0 = sem vacuolização, escore 1 (discreta vacuolização), escore 2 (moderada vacuolização) e escore 3 (acentuada vacuolização).

Tabela 2- Média de vacuolização em neurópilo e neurônios das regiões avaliadas nas secções de encéfalo de ovinos com scrapie

Local	Ovino 1			Ovino 2			Ovino 3		
	Neurópilo	Neurônios	*G	Neurópilo	Neurônios	G	Neurópilo	Neurônios	G
Côrrix parietal									
Substância branca	4	0		1	0		6	0	
Substância cinzenta	4	0		0	0		0	0	
Média	4	0	2	0,5	0	1	3	0	2
Hipocampo esquerdo	1	0		1	0		8	0	
Hipocampo direito	2	0		1	0		6	0	
Média	1,5	0	1	1	0	1	7	0	3
Tálamo esquerdo	8	0		5	0		8	0	
Tálamo direito	8	2		4	0		11	0	
Média	8	1	3	4,5	0	2	9,5	0	3
Côrrix frontal	Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios	
Substância branca	7	0		2	0		4	0	
Substância cinzenta	2	0		0	0		1	1	
Média	4,5	0	2	1	0	1	2,5	0,5	2
Núcleos da base esquerdo	1	0		4	0		2	0	
Núcleos da base direito	3	0		2	0		1	0	
Média	2	0	1	3	0	2	1,5	0	1
Colículos	Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios	
1 - Dorsal esquerda	7	0		11	0		2	0	
2- Dorsal direita	9	0		13	0		2		
3 - Ventral esquerda	3	2		6	2		7		
4 - Ventral direita	3	0		17	2		3	0	
Média	5,5	0,5	3	11,75	1	3	3,5	0	3
Côrrix occipital	Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios	
1 - Substância branca	6	0		2	0		0		
2 - Substância branca	0	0		0	0		0		
3 - Substância cinzenta	0	0		0	0		3		
4 - Substância cinzenta	0	0		0	0		0	0	
Média	1,5	0	1	0,5	0	1	0,75	0	1
Medula oblonga à altura do óbex	Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios		Neurópilo	Neurônios	
1 – dorsal	5	1		13	0		2		
2 – ventral	4	0		5	1		1		

3 – direita	10	0	1	0	1			
4 – esquerda	6	0	12	0	2		0	
Média	6,25	0,25	3	7,75	0,25	3	1,5	0,25
Ponte	Neurópilo	Neurônios	Neurópilo	Neurônios	Neurópilo	Neurópilo	Neurônios	
1 – centro	2	0	8	1	1			
2 - direita	3	0	0	1	1		0	
3 – esquerda	2	0	11	0	8		0	
Média	2,3	0	2	6,3	0,7	3	3,3	0
Cerebelo								
Camada da granulosa								
1	0	-	7	-	0			
2	0	-	3	-	0			
3	1	-	2	-	0			
Média	0,3	-	1	4	-	3	0	0
Camada de Purkinge								
1	-	0	-	2	-			0
2	-	0	-	1	-			0
3	-	0	-	1	-			0
Média	-	0	0	-	1,3	1	0	0
Substância branca – preto								
1	4	-	12	-	2			
2	3	-	2	-	2			
3	4	-	7	-	2			
Média	3,7	-	2	7	-	3	2	1
Camada molecular -								
1	2	-	5	-	0			
2	1	-	5	-	0			
3	0	-	1	-	0			
Média	1	-	1	3,7	-	2	0	0
Medula espinhal								
Neurópilo	Neurônios	Neurópilo	Neurônios	Neurópilo	Neurônios	Neurópilo	Neurônios	
1 - corno dorsal	3	0	36	0	0			
2 - corno dorsal	5	0	43	0	0			
3 - corno ventral	2	0	2	1	0			
4 - corno ventral	0	0	0	1	0		0	
Média	2,5	0	2	20,2	0,5	3	0	0

*G = classificação do grau de vacuolização por localização avaliada (neurônio e neurópilo): 0 sem vacuolização, 1 discreta, 2 moderada e 3 acentuada.

Tabela 3 – Sinais clínicos de ovinos com scrapie no estado de Santa Catarina. Distribuição e classificação dos genótipos do gene PRNP de acordo com *National Scrapie Surveillance Plan (USDA)*, 2010.

Genótipo	Ovino 1 ARQ/ARQ R3 Baixa resistência	Ovino 2 ARQ/VRQ R5 Alta suscetibilidade	Ovino 3 ARR/AHQ R2 Resistente
Grau de suscetibilidade			
Sinal clínico			
Prurido/ Alopecia	Sim	Sim	Sim
Tremor	Não	Sim	Não
Cifose	Sim	Não	Não
Decúbito esternal	Sim	Não	Não
Postura de cão sentado	Sim	Não	Não
Déficit proprioceptivo	Sim	Não	Não
Redução da dor profunda	Sim	Não	Não
Ausência de dor superficial	Sim	Não	Não
Espasticidade	Sim	Não	Não
Fasciculações musculares	Sim	Sim	Não
Teste positivo de Scratch	Sim	Não	Não

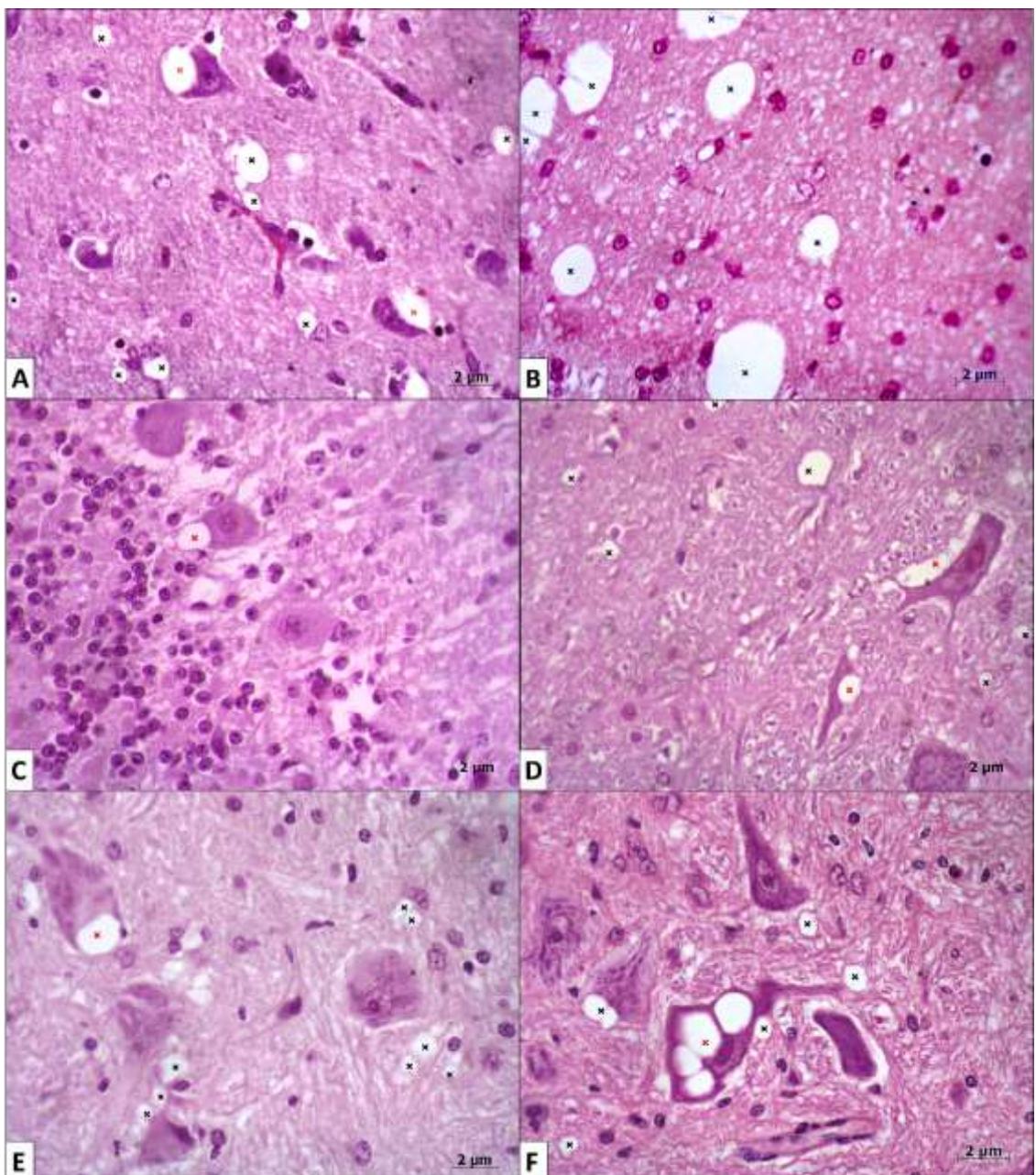


Figura 10: Marcações das vacuolizações em encéfalo de ovinos com *scrapie*. Em vermelho vacuolização neuronal e em preto vacuolização em neurópilo. A – Ovino 2: Tálamo. B – Ovino 3: Hipocampo. C – Ovino 2: Cerebelo. D – Ovino 2: Colículos rostrais. E – Ovino 2: Ponte. F – Ovino 1: Medula oblonga à altura do óbex.

6.4 DISCUSSÃO

Todos os ovinos deste estudo eram Dorper e mestiços da raça, a qual tem sido associada aos casos de *scrapie* no Brasil (ANDRADE et al. 2015). A raça Dorper é a que apresenta maior prevalência de genótipos classificados com o grau 5 de suscetibilidade a desenvolver *scrapie* no Brasil, seguida das raças Ile

de France, Santa Inês Pantanal Crioulo e Morada Nova (IANELLA et al., 2012). Os polimorfismos nos códons 136, 154 e 171 do gene PRPN irão modular a suscetibilidade dos ovinos, sendo que a predisposição ao desenvolvimento à *scrapie* aumenta em raças que podem expressar valina no códon 136, quando há estes polimorfismos (HUNTER et al., 1994; GONZÁLEZ et al., 2012). A raça Suffolk dificilmente possui o polimorfismo deste códon, portanto, a doença ocorre principalmente nos animais QQ171 (HUNTER et al., 1997). Na Europa os animais mais susceptíveis são os da Raça Suffolk, Shetland, Scottish Halfbred e Bleu du Maine (HUNTER et al., 1994; HUNTER et al., 1997).

A evolução clínica geralmente é de 10 dias a meses dependendo da quantidade de deposição de PRP^{Sc} até a morte do animal (CANTILE & YOUSSEF, 2015; CASSMANN et al., 2019), nos casos avaliados todos os animais foram eutanasiados, portanto não se pode estimar o tempo de evolução. O ovino 1 foi eutanasiado aproximadamente 40 após a apresentação clínica e o ovino 2 60 dias após.

Dois animais do segundo relato (ovinos 4 e 5) eram resultado do cruzamento dos ovinos 2 e 3, que apresentarem positividade para a detecção do príon, no entanto as progênieis foram negativas, porém, esses animais até o momento deste estudo eram jovens. Possivelmente após o período de incubação, que é de aproximadamente dois anos, os ovinos podem desenvolver a doença, pois a principal característica da enfermidade é a cronicidade (LEZMI et al., 2011). Os quatro ovinos eram criados no mesmo local e alocados no mesmo aprisco, portanto, a transmissão horizontal do macho para a fêmea pode ter ocorrido em algum momento e possivelmente os dois animais que inicialmente não foram positivos para o *scrapie* futuramente podem desenvolver a doença e caso isso se confirme a transmissão pode ser tanto de forma horizontal quanto vertical. A transmissão pode ocorrer por consumo de leite de fêmeas que estão eliminando o príon pelo leite ou até mesmo por placenta a qual possui alta concentração da proteína, portanto a transmissão vertical e horizontal são importantes fatores epidemiológicos nos casos *scrapie* que devem ser considerados neste caso (PATTISON et al., 1972; SIMMONS et al., 2007; KONOLD et al., 2013; KONOLD et al., 2016; MADSEN-BOUTERSE et al., 2018).

A enfermidade tem como características o teste de coçar manualmente o dorso do animal que irá responder com reflexo de “mordiscar”, além de perda de

peso e da lã (MARTINS et al., 2012). Apenas o ovino 1 desenvolveu estes quadros além de cifose, e todos estavam com lesões crostosas e prurido. A ovelha (ovino 3) no momento da coleta apresentava, apenas sinais inespecíficos como alopecia na face, pois este animal encontrava-se em fase pré-clínica, sendo positivo na IHQ e com lesões histopatológicas em hipocampo. Acredita-se que com a evolução e progressão das lesões esse animal possivelmente iria desenvolver quadro neurológico da doença.

Animais que são clinicamente saudáveis geralmente não desenvolvem alterações vacuolares mesmo sendo positivos na imuno-histoquímica, animais que possuem vacuolização em intensidade acentuada geralmente desenvolvem quadros neurológicos (WOOD et al., 1997). Portanto, podemos considerar que o ovino 3 provavelmente seja um animal com certa resistência ao desenvolvimento a doença. Entretanto a ocorrência de vacuolização do sistema nervoso central não é pré-requisito para o desenvolvimento dos sinais clínicos neurológicos (RYDER et al., 2009).

Macroscopicamente comumente não são observadas lesões, entretanto, alguns indícios podem auxiliar na suspeita e no diagnóstico da doença, como estado corporal ruim e extensas áreas deslanadas devido ao ato de coçar (MARTINS et al., 2012; MELING et al. 2012). Sendo assim, o diagnóstico pré-clínico com a utilização de biópsias de tecido linfoide da terceira pálpebra e da mucosa retal são fundamentais para evitar a propagação do príon em casos suspeitos, porém cabe ressaltar que é importante realizar a biópsia tanto da mucosa de terceira pálpebra quanto de mucosa retal, pois como descrito por Leal et al. (2012), nem sempre pode ocorrer imunomarcação nos dois locais avaliados (BRASIL, 2009; LEAL et al., 2012), também pode não haver imunomarcação em determinados casos, pois nem sempre há envolvimento do tecido linfoide na patogênese da doença (MONLÉON et al., 2011).

As lesões histológicas causadas por príons são caracterizadas por vacuolização tanto em neurópilo quanto em neurônios sem infiltração de células inflamatórias (MARÍN-MORENO et al., 2021). Essas vacuolizações são consideradas de maior intensidade na região do óbex, apesar de também ser observadas em outras regiões (MARTINS et al., 2012; GREENLEE et al., 2019). Este padrão histológico também é observado quando há manipulação do neurópilo produzindo artefatos, edema de mielina, mielopatias espongiformes,

alterações neuronais causadas por vírus, ou toxinas, distúrbios metabólicos e doença do deposito lisossomal (WOHLSEIN et al, 2013). Nos casos deste estudo além da observação dos vacúolos, o quadro clínico e os exames complementares foram importantes para excluir as alterações supracitadas de artefatos ou outras condições que cursam com quadros clínicos neurológicos (WOHLSEIN et al, 2013; PRINS et al, 2023).

Considerou-se lesão vacuolar apenas os vacúolos bem circunscritos, pois a manipulação do tecido neuronal pode causar artefatos induzindo ao avaliador erros de interpretações (WOHLSEIN et al, 2012).

Diferentemente do que é usualmente descrito nessa doença, o local que mais foi observado vacúolos no sistema nervoso central foi a medula espinhal da região cervical do ovino 1, os colículos rostrais do ovino 2 e o ovino 3 na região do hipocampo. Sendo assim, o quadro de cifose observado no ovino 1 compatível com o grau de comprometimento da região da medula, embora outras estruturas responsáveis por coordenação como colículos rostrais, medula oblonga à altura de óbex e ponte tenham sido afetadas (grau de comprometimento nesta ordem de vacuolização). No ovino 2, que desenvolveu um quadro com alteração comportamental a ordem de comprometimento foi primeiro em colículos rostrais, seguida da medula oblonga à altura de óbex e ponte, semelhante ao que foi observado no ovino 1. As lesões observadas no colículos rostrais (mesencéfalo), óbex e ponte são mais frequentes nos casos de *Scrapie* (SALVESEN et al. 2020), assim como foi observado nos ovinos 1 e 2.

O tálamo e o hipocampo da ovelha 3, foram as estruturas que mais foram afetadas, assim como observado por Sofianidis et al (2006), que observou maior grau de vacuolização no tálamo de cabras, porém não houve alteração clínica neurológica do ovino 3, apesar da severidade da lesão morfológica observada. Possivelmente este animal passaria a desenvolver alterações comportamentais se o período de incubação fosse alcançado, pois se optou pela eutanásia devido ao risco de transmissão aos demais animais (Ovinos 4 e 5) que foram negativos na IHQ. As cabras do estudo deste mesmo autor também não desenvolveram sinais clínicos, entretanto, não houve relação entre grau de lesão, local de lesão e sinais clínicos (SOFIANIDIS et al 2006).

Cabe ressaltar que o animal que havia maior grau de comprometimento em neurônios de Purkinge e demais estruturas do cerebelo foi o que desenvolveu

tremores musculares, este último sinal também foi observado no ovino 1, além de teste de “scratch” positivo (apenas ovino 1) estes sinais clínicos que são considerados comuns nos casos de *scrapie* (MARTINS et al., 2012; KONOLD et al, 2013). O sinal clínico neurológico que foi considerado incomum foi a cifose no animal 1, apesar disso as alterações vacuolares foram similares as observadas nos casos descritos de *scrapie* (SOFIANIDIS et al 2006).

O que pode explicar a não ocorrência de um quadro clínico com alterações neurológicas de *scrapie* no ovino 3, pode ser a classificação quanto ao grau de suscetibilidade, pois o animal foi classificado como resistente (R2), ao contrário dos outros dois ovinos que desenvolveram quadros característicos de alteração neurológica sendo o ovino 2 o mais suscetível (R5) e o ovino 1 de baixa resistência (R3). Sugere-se que quanto mais resistentes ao desenvolvimento da doença, mais longo será o período de desenvolvimento de sinais clínicos específicos. De acordo com McIntyre et al. (2006), o desenvolvimento do quadro clínico vai depender da carga infecciosa, idade em que o animal foi exposto e a susceptibilidade vai depender da idade do animal e o período de incubação. No surto avaliado por estes autores contatou-se que a ocorrência de *Scrapie* nos ovinos com genótipo VRQ/VRQ iniciou antes quando comparado com animais VRQ/ARQ seguidos por animais do genótipo VRQ/ARR. Esta comparação com os animais deste estudo não foi possível de ser realizada, pois os casos estudados eram de animais infectados naturalmente, não sendo possível estabelecer o período de incubação. Um surto ocorrido no Rio Grande do Sul, apenas animais classificados como de baixa resistência (R3) desenvolveram prurido, dificuldade de locomoção e distúrbios de movimento (ANDRADE et al. 2013), mesma classificação do ovino 1, que desenvolveu o quadro mais grave.

O presente estudo foi baseado em metodologias similares que também estabeleceram escores para graduação das lesões neurológicas, portanto foi realizada uma adaptação da graduação e dos escores (FRASER & DICKINSON 1973; SALVESEN et al., 2020). Assim, observou-se escore maior em todos colículos rostrais, na medula oblonga à altura de óbex dos animais 1 e 2, tálamo dos ovinos 1 e 3. Dados semelhantes aos encontrados em um estudo realizado em caprinos na região do tálamo que obteve maior escore em objetiva de 40x, porém em medula oblonga à altura de óbex esses escores caíram consideravelmente nos caprinos se compararmos com os escores obtidos no

presente estudo (SALVESEN et al., 2020). O hipocampo do ovino 3 foi a região mais afetada juntamente com o tálamo e colículos rostrais neste estudo, quando comparado com o estudo de Salvesen et al., (2020), que foi considerado com escore médio de vacuolização desta mesma região. Neste estudo envolvendo cabras o autor citou que todos os animais positivos para *scrapie* desenvolveram alopecia moderada em diferentes regiões como barriga, região pélvica e de pescoço, ranger de dentes, hiper-reatividade nos testes “scratch” e comportamento agressivo de morder a cauda e a área perianal e de chifre, poucas desenvolveram depressão. Diferentemente destes casos o ovino 3 do presente estudo desenvolveu lesão crostosa apenas na cabeça e o os ovinos 1 e 2, alopecia em dorso e membros respectivamente. O teste de “scratch” foi positivo apenas no animal 1 que também adquiria posição de cão sentando e cifose, este último considerado incomum nos quadros clássicos de *scrapie*.

A maior média de vacuolização dos cérebros avaliados no presente estudo foi observada em neurópilo de medula espinhal do ovino 2, e nos ovinos 1 e 3 a região com maior número de vacúolos foi o tálamo. Em um estudo realizado com caprinos onde graduou-se de 0 a 5, observou-se maior grau de vacuolização em tálamo (grau 4), seguido da substância cinzenta do colículo rostral, núcleos septais e hipocampo (grau 3). Neste estudo mencionado foi atribuído a classificação com grau 3 quando havia moderado número de vacúolos (10 a 20) e grau 4 era atribuído para regiões com mais de 20 vacúolos com tendência a coalescer (SALVESEN et al., 2020). Assim como observado por Salvesen et al., (2020), o tálamo foi a região com maior número de vacúolos na maioria dos casos.

A medula espinhal mostrou-se importante para a identificação de lesões vacuolares, entretanto, não foi realizado a avaliação de todas as porções como intumescência cervical e lombar, apenas a porção inicial que fica próxima a medula oblonga na altura do óbex. A avaliação dessas porções é considerada importante, pois a deposição da proteína priônica ocorre frequentemente neste órgão, e possivelmente a porta de entrada do príon seja através de neurônios motores parassimpáticos no nervo vago que inervam o trato gastrointestinal (RYDER et al., 2001). A IHQ do sistema nervoso central é um ótimo método para realização do diagnóstico definitivo (RYDER et al., 2001; SOFIANIDIS et al., 2006; DUSTAN et al., 2008). Porém, neste estudo o sistema nervoso central dos

animais não passaram por IHQ, todos foram diagnosticados por meio de IHQ de biópsia de terceira pálpebra, este método tem demonstrado alto valor no diagnóstico de animais que ainda não desenvolveram sinais clínicos (ANDRADE et al., 2015). Porém, de acordo com Monleón et al., (2011), a utilização desse método demonstrou níveis não detectáveis em animais positivos de PrP^{sc} em tecido linfoide biopsiado.

Embora o grau de vacuolização em sistema nervoso central de ovinos seja estudado nos casos de *scrapie*, a associação da vacuolização em diferentes regiões do encéfalo com as alterações clínicas em ovinos ainda não foi realizada, sendo assim, este trabalho pode ser considerado pioneiro e servir como base para estudos futuros (MOULD et al., 1967; FRASER & DICKINSON, 1973; SCOTT & FRASER, 1984; SALVESEN Ø, et al. 2020).

6.5 CONCLUSÃO

A associação de vacuolização do sistema nervoso central com o desenvolvimento do quadro clínico não foi possível de ser estabelecido devido ao baixo número de ovinos avaliados. Porém, é possível afirmar que o grau de vacuolização pode influenciar na gravidade do quadro neurológico. A região da medula espinhal, colículos rostrais e medula oblonga na altura do óbex foram as mais acometidas e podem ser associados a alterações comportamentais com o desenvolvimento de prurido, quedas, cifose e fasciculações.

6.6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. L. et. al. Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p.21-29, 2013.

ANDRADE, C. P. et al. Report of outbreaks of classical *Scrapie* in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.6, p.1203–1212, 2015.

BECK, K. E. et al. Ovine PrP genotype is linked with lesion profile and immunohistochemistry patterns after primary transmission of classical *Scrapie* to wild-type mice. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. V. 65, n. 5, p. 483-497, 2010.

BENESTAD, S. L. et al. Cases of *Scrapie* with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. **Veterinary Record**, v.153, p.202-208, 2003.

BRASIL. Portaria nº 79, de 27 de julho de 2018. Brasil. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, 2018.

CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's. **Pathology of Domestic Animals**. Vol.1. 6th ed. Elsevier, Philadelphia, p. 250-406, 2015.

CASSMANN, E. D. et al. Sheep with the homozygous lysine-171 prion protein genotype are resistant to classical *Scrapie* after experimental oronasal inoculation. **Veterinary Pathology**, v.56, n.3, p.409–417, 2019.

COBB, N. J. & SUREWICZ, W. K. Prion Diseases and their biochemical mechanisms. **Biochemistry**, v.48, n.12, p. 2574–2585, 2009.

DAWSON, M. et al. Progress and limits of PrP gene selection policy. **Veterinary Research**, v.39, n.4, p.1-12, 2008.

DUSTAN, B. H. et al. A histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases. **Veterinary Pathology**, v.45, n.4, p.443-54, 2008.

FRASER, H.; DICKINSON, A. G. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. **Journal of Comparative Pathology**, v.83, n.1, p.29-40, 1973.

GLATZEL, M. et al. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. **Neuron**, v. 31, p.25–34, 2001.

GONZÁLEZ, L. et al. Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of *Scrapie* in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the oral and conjunctival routes. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, p.47-56, 2014.

GREENLEE, J. J. Review: Update on classical and atypical *Scrapie* in sheep and goats. **Veterinary Pathology**, v.56, n.1, p.6–16, 2019.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, 95-98, 1999.

HAMIR, A. N. et al. Experimental transmission of sheep *Scrapie* by intracerebral and oral routes to genetically susceptible Suffolk sheep in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.3–9, 2005.

HUNTER, N. et al. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. **Archives of Virology**, v.137, p.171–177, 1994.

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

- IANELLA, P. et al. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. **Research in Veterinary Science**, v.93, n.1, p.219–225, 2012.
- KIMBERLIN, R. H. Transmissible encephalopathies in animals. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.30-37, 1990.
- KONOLD, T. et al. Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. **BMC Veterinary Research**, v.9, n.99, 2013.
- KONOLD, T. et al. Evidence of scrapie transmission to sheep via goat milk. **BMC Veterinary Research**, v.17, n.12, p.208, 2016.
- LADOGANA, A. et al. Mortality Creutzfeldt-Jakob disease and related desordens in Europe, Australia, and Canada. **Neurology**, v.10, n.64, p. 1586-91, 2005.
- LEAL, J. S. et al. Use of third eyelid and rectal mucosa biopsies for diagnosis of sheep *Scrapie* on a farm in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.32, n.10, p.990–994, 2012.
- Lezmi, S. et al. Comparison of brain PrP^d distribution in ovine BSE and scrapie. **Veterinary Pathology**, v.48, n.6, p.1101-8, 2011.
- LINDEN, R. et al. Physiology of the prion protein. **Physiological Reviews**, v.88, n.2, p.673-728, 2008.
- MARÍN-MORENO, A. et al. Classical scrapie in small ruminants is caused by at least four different prion strains. **Veterinary Research** v.52, n.57, 2021.
- MARTINS, H. M. et al. *Scrapie* and differential diagnosis in sheep in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.32, n.12, p.1230–1238, 2012.
- MADSEN-BOUTERSE, S. A. et al. Low-volume goat milk transmission of classical *Scrapie* to lambs and goat kids. **PloS One**. V.20, n.13, e0204281, 2018.
- MELING, S. et al. Presence of an acute phase response in sheep with clinical classical scrapie. **BMC Veterinary Research** v.8, n.113, 2012.
- MELONI, D. et al. EU-approved rapid tests for bovine spongiform encephalopathy detect atypical forms: a study for their sensitivities. **PloS One**, v.7, n.9, p.e43133, 2012.
- MONLEÓN, E. et al. An assessment of the efficiency of PrP^{Sc} detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. **Veterinary Microbiology**, v.147, n.3-4, p.237-43, 2011.
- MOULD, D. L. et al., Relationships between chemical changes and histological damage in the brains of *Scrapie* affected mice, **Journal of Comparative**

Pathology, v. 77, n. 4, p. 393-403, 1967.

PATTISON, I. H. et al. Spread of *Scrapie* to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from *Scrapie*-affected sheep. **Veterinary Record**, v.22, n.90, n.465-8, 1972.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13363–13383, 1998.

ROELS, S. et al. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population: Some preliminary data. **Veterinary Quarterly**, v.26, n.1, p.3-11, 2004.

RYDER, S. J. et al. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. **Veterinary Record**, v.148, n.1, p. 7–13, 2001.

SANTOS, C. R. et al., Genotyping of polymorphisms in the PRNP gene in Santa Ines sheep in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research**, v.32, n.3, p.221-226, 2012.

SIMMONS, M. M. et al. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. **BMC Veterinary Research**, v.3, n.20, 2007.

SALVESEN, Ø. et al. Goats naturally devoid of PrP^C are resistant to scrapie. **Veterinary Research**, v.10, n.51, p.1 2020

SCOTT, J. R.; FRASER, H. Degenerative hippocampal pathology in mice with scrapie. **Acta Neuropathol** v.65, p.62–68, 1984.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673, 1994.

WOHLSEIN, P.; DESCHL, U.; BAUMGÄRTNER, W. Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. **Veterinary Pathology**, v.50, n.1, p.122-143, 2013.

WOOD, J. L. et al. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. **Veterinary Record**, v.140, n. 7, p.167-74, 1997.

7 CONCLUSÃO

No estudo retrospectivo foram descritos entre 2017 a 2020 um surto e um caso isolado de *scrapie* em Santa Catarina, na região do Vale do Itajaí.

No estudo prospectivo foi realizado o diagnóstico de um surto no município de Blumenau.

Com a genotipagem foi possível identificar os animais susceptíveis. O elevado número de ovinos positivos para *scrapie* é reflexo do alto número de animais classificados nos grupos susceptíveis resultando em um quadro clínico característico e avaliação de IHQ anti-PrP^{sc} de biópsias de tecidos linfoides positiva.

Apesar da tentativa de associação de vacuolização do sistema nervoso central com o desenvolvimento do quadro clínico não foi possível de ser estabelecido devido ao baixo número de animais avaliados. Porém, assim como já observado em outros estudos acredita-se que o acometimento do sistema nervoso central irá depender da quantidade de príons no organismo, local de acometimento do sistema nervoso central e genótipo do animal.

8 REFERÊNCIAS

- ACCS, 2019. Associação Catarinense de Criadores de Suínos. **Relatório 2019**, p.1-27, 2019.
- ALARCON, P. et al. A review of cleaning and disinfection guidelines and recommendations following an outbreak of classical Scrapie. **Preventive Veterinary Medicine**, v.193, p.1-9, 2021.
- ALMEIDA, T. L. et. al. Doenças de ovinos diagnosticadas no Laboratório de Anatomia Patológica Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (1996-2010). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p.21-29, 2013.
- ANDRADE, C. P. et al. Single nucleotide polymorphisms at 15 codons of the prion protein gene from a Scrapie-affected herd of Suffolk sheep in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.31, n.10, p.893–898, 2011.
- ANDRADE, C. P. et al. Report of outbreaks of classical Scrapie in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.6, p.1203–1212, 2015.
- ANDREOLETTI, O. et al. Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural Scrapie. **Journal of General Virology**, v.81, n.12, p.3115–3126, 2000.
- BARAITAREANU, S. et al. Comparison of the ovine prion protein genotype profiles of breeds Tigae with Black Head and Merino. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, vol.37, n.6, p.625-630, 2013.
- BECK, K. E. et al. Ovine PrP Genotype is linked with lesion profile and immunohistochemistry patterns after primary transmission of classical Scrapie to wild-type mice. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**. V. 65, n. 5, p. 483-497, 2010.
- BENESTAD, S. L. et al. Cases of Scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. **Veterinary Record**, v.153, p.202-208, 2003.
- BRASIL. Instrução normativa Mapa nº15, de 2 de abril de 2008, sobre a regulamentação e outras providências. Brasil. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, 2008.
- BRASIL. Manual de Legislação: programas nacionais de saúde animal do Brasil. Departamento de Saúde Animal, **Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília**. p.440, 2009.
- BRASIL. Portaria nº 79, de 27 de julho de 2018. Brasil. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, 2018.
- CANTILE, C.; YOUSSEF, S. Nervous System. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's. **Pathology of Domestic Animals**. Vol.1. 6th ed. Elsevier, Philadelphia, p. 250-406, 2015.

- CASSMANN, E. D. et al. Sheep with the homozygous lysine-171 prion protein genotype are resistant to classical Scrapie after experimental oronasal inoculation. **Veterinary Pathology**, v.56, n.3, p.409–417, 2019.
- COBB, N. J.; SUREWICZ W. K. Prion Diseases and Their biochemical mechanisms. **Biochemistry**. V.48, n.12, p. 2574–2585, 2009.
- COOK, R. W. et al. Atypical Scrapie in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v.94, n.12, p.452-455, 2016.
- DAWSON, M. et al. Progress and limits of PrP gene selection policy. **Veterinary Research**, v.39, n.4, p.1-12, 2008.
- ESTEVES, A. et al. Scrapie at abattoir: monitoring, control, and differential diagnosis of wasting conditions during meat inspection. **Animals**, v.11, n.11, 2021.
- FERNANDES, R. et al. ‘Scrapie’ em ovinos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.6, p.139–143, 1978.
- FRASER, H.; DICKINSON, A. G. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. **Journal Comparative Pathology**, v.83, n.1, p.29-40, 1973.
- GAJDUZEK, D. C.; ZIGAS, V. Degenerative disease of the central system in New Guiné. **The New England Journal Medicine**, v.257, p.974-978, 1957.
- GLATZEL, M. et al. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. **Neuron**, v. 31, p.25–34, 2001.
- GONZÁLEZ, L. et al. Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of Scrapie in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the Oral and Conjunctival Routes. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, p.47-56, 2014.
- GREENLEE, J. J. Review: Update on classical and atypical Scrapie in sheep and goats. **Veterinary Pathology**, v.56, n.1, p.6–16, 2019.
- GUBBINS, S.; RODEN, J. A. Breeding programmes for TSE resistance in British sheep: II. Assessing the impact on the prevalence and incidence of Scrapie. **Preventive Veterinary Medicine**, v.73, n.1, p.17–31, 2006.
- GÜREL, A. et al. Scrapie cases in the Northern Cyprus. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v.37, n.3, 2013.
- HALL, T. A. (BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

- HAMIR, A. N. et al. Experimental transmission of sheep Scrapie by intracerebral and oral routes to genetically susceptible Suffolk sheep in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.3–9, 2005.
- HOUSTON, F. et al. Comparative susceptibility of sheep of different origins, breeds and PRNP genotypes to challenge with bovine spongiform encephalopathy and Scrapie. **PloS ONE**, v.10, n.11, p.1-17. 2015.
- HUNTER, N. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. **Trends Microbiol**, v.5, n.8, p.:331-4.,1997.
- HUNTER, N. Scrapie and experimental BSE in sheep. **British Medical Bulletin**, v.66, p.171–183, 2003.
- IANELLA, P. et al. PRNP haplotype and genotype frequencies in Brazilian sheep: Issues for conservation and breeding programs. **Research in Veterinary Science**, v.93, n.1, p.219–225, 2012.
- IBGE 2002. Pesquisa da Pecuária Municipal 2017. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://IBGE.gov.br>> Acesso em 4 abr. 2021.
- IBGE 2010. Pesquisa da Pecuária Municipal 2019^a. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em <<http://IBGE.gov.br>> Acesso em 4 abr. 2021.
- IBGE 2019. Pesquisa da Pecuária Municipal 2019^b. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária**, 2019.
- IRONSIDE, J. W. Neuropathological diagnosis of prion disease. **Prion Diseases**, p. 35-57, 1998.
- JACOB, V. A. Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. **Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie**, v.64, p.147–228, 1921.
- KIMBERLIN, R. H. Transmissible encephalopathies in animals. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.30-37, 1990.
- KITTELBERGER, R. et al. Evaluation of two commercial, rapid, ELISA kits testing for scrapie in retro-pharyngeal lymph nodes in sheep. **N Z Vet J**. v.62, n.6, p.343–350 2014.
- KONOLD, T. et al. Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. **BMC Veterinary Research**, v.9, n.99, 2013.
- LADOGANA, A. et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. **Neurology**. V.10, n.64, p.1586-91, 2005.

- LEAL, J. S. et al. Use of third eyelid and rectal mucosa biopsies for diagnosis of sheep Scrapie on a farm in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.32, n.10, p.990–994, 2012.
- LEE, I. Y. et al. Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. **Genome research**, v.8, p.1022–1037, 1998.
- LINDEN, R. et al. Physiology of the prion protein. **Physiological Reviews** v.88, n.2, p.673-728. 2008;
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº 15, de 2 de abril de 2008**. Procedimentos para a atuação em casos de suspeita ou ocorrência de paraplexia enzoótica dos ovinos (Scrapie). 2008. P.1–23.
- MARTINS, H. M. et al. Scrapie and differential diagnosis in sheep in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.32, n.12, p.1230–1238, 2012.
- MADSEN-BOUTERSE, S. A. et al. Low-volume goat milk transmission of classical Scrapie to lambs and goat kids. **PLoS One**. V.20, n.13, e0204281, 2018.
- MCINTYRE, K. M. et al. The time-course of a scrapie outbreak. **BMC Veterinary Research**, v.13, n.2, 2006.
- MCMANUS, C. et al. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Brazilian Journal of Animal Science**. V.39, p.236-246, 2010.
- MERWE, G. F. The first occurrence of Scrapie in the republic of South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.37, 1966.
- MILLER, M. W. et al., Environmental Sources of Prion Transmission in Mule Deer. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.6, 2004.
- MOORE, S. J. et al. Comparison of two US sheep Scrapie isolates supports identification as separate strains. **Veterinary Pathology**., v.53, n.6, p.1187-1196, 2016.
- MOULD, D. L. et al. Relationships between chemical changes and histological damage in the brains of Scrapie affected mice, **Journal of Comparative Pathology**, v. 77, n. 4, p. 393-403, 1967.
- O'ROURKE, K. I. et al. Preclinical diagnosis of Scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3254–3259, 2000.
- ONODERA, T. et al. Isolation of Scrapie Agent from the Placenta of Sheep with Natural Scrapie in Japan. **Microbiology and Immunology**. v.37, n.4, p.311–6, 1993.

ORTIZ-PELAEZ, A.; THOMPSON, C. E.; DAWSON, M. The impact of the national Scrapie plan on the PRNP genotype distribution of the British national flock, 2002-2012. **Veterinary Record**, v.24, n.74, p.530, 2014.

PATTISON, I. H. et al. Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from Scrapie-affected sheep. **Veterinary Record**, v.22, n.90 p.465-8, 1972.

PRINS, S. et al., O-074 Atypical scrapie in a seven-year-old Herdwick ewe. **Animal - science proceedings**, v.14, n.1, p.110, 2023.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause Scrapie. **Science**, v.216, n.4542, p.136–144, 1982.

PRUSINER, S. B. Molecular biology of prion diseases. **Science**, v.252, p.1515–1522, 1991.

PRUSINER, S. B. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, p. 13363–13383, 1998.

QUEVEDO, L. S. et al. *Scrapie em ovino em Santa Catarina: relato de caso. Anais do 6º Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária e XX Encontro Nacional de Patologia*, 2021.

RISSI, D. R. et al. Ocorrência de raiva em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.10, p.495–500, 2008.

ROELS, S. et al. Detection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population: Some preliminary data. **Veterinary Quarterly**, v.26, n.1, p.3-11, 2004.

RYDER, S. J. et al. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. **Veterinary Record**, v.148, n.1, p. 7–13, 2001.

SANTOS, C. R. et al., Genotyping of polymorphisms in the PRNP gene in Santa Ines sheep in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Research** v.32, n.3, p.221-226, 2012.

SOFIANIDIS, G. et al. Histopathological and immunohistochemical features of natural goat scrapie. **Journal Comparative Pathology**. v.135, n.2-3, p.116-129, 2006.

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

SALVESEN, Ø. et al. Goats naturally devoid of PrP^C are resistant to scrapie. **Veterinary Research** Jan v.10, v.51, n.1, 2020.

SCHNEIDER, D. A. et al. The placenta shed from goats with classical Scrapie is infectious to goat kids and lambs. **Journal of General Virology**, v.96, n.8, p.2464–2469, 2015.

SCOTT, J.R.; FRASER, H. Degenerative hippocampal pathology in mice infected with scrapie. **Acta Neuropathol** v.65, p.62–68, 1984.

SOTOMAIOR, C. S. et al. Prion protein gene polymorphisms in sheep in the state of Paraná, Brazil. **Animal Genetics**, v.39, n.6, p.659–661, 2008.

TAMGÜNEY, G. et al. Salivary prions in sheep and deer. **Prion**, v. 6, n.1, p.52-61, 2012.

THOMPSON, J. D.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p.4673–4680, 1994.

USDA-APHIS. United States Department of Agriculture. **National Scrapie surveillance plan**, 2010.

USDA-APHIS.United States Department of Agriculture. **Scrapie program standards**, Volume 1 :National Scrapie eradication program, v.1, 2019.

VRENTAS, C. E.; GREENLEE, J. J.; TATUM, T. L.; NICHOLSON E. M. Relationships between PrPSc stability and incubation time for United States Scrapie isolates in a natural host system. **PLoS One**, v.7, n.8, e43060, 2012.

WOAH. World Organisation for Animal Health – World Animal Health Information System. **Veterinary Services through**, 2021.

WOAH World Organisation for Animal Health. Scrapie. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2016. **OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. P.1502–1512, 2018.

WOHLSEIN, P.; DESCHL, U.; BAUMGÄRTNER, W. Nonlesions, unusual cell types, and postmortem artifacts in the central nervous system of domestic animals. **Veterinary Pathology**. v.50, n.1, p.122-143, 2013.