

## INSPECÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM PEQUENOS RUMINANTES

HELENA VALA\*  
JOÃO MESQUITA\*\*  
FERNANDO ESTEVES\*\*  
FÁTIMA PINHO\*\*\*

\*Docente da Escola Superior Agrária  
e investigadora do Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde (CI&DETS) do Instituto Politécnico de Viseu.

\*\* Docente da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu.

\*\*\* Ex-Aluna da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu.

### Resumo

O Scrapie é uma doença neurodegenerativa fatal que afecta ovinos e caprinos e é a forma mais comum das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's), que incluem a doença de Creutzfeldt – Jakob (CJD), em humanos, e a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE). O Plano de Vigilância Activa do Scrapie, em aplicação na União Europeia desde 2002, permitiu determinar uma prevalência de Scrapie superior ao esperado. De forma a efectuar uma avaliação preliminar da incidência desta patologia em Portugal, foram recolhidos os troncos cerebrais e cerebelos de 4822 pequenos ruminantes abatidos num matadouro no centro de Portugal e, posteriormente, enviados para pesquisa laboratorial de EETs. Após análise laboratorial, detectaram-se 8 casos de Scrapie atípico em ovinos. A percentagem de casos positivos (0,17%) detectados em pequenos ruminantes com mais de 18 meses, durante o período de realização deste estudo, foi baixa e, segundo os resultados laboratoriais, enquadram-se no perfil de Scrapie atípico.

**Palavras-chave:** Pequenos Ruminantes, Plano de Vigilância, EET.

### Abstract

Scrapie is a fatal, neurodegenerative disease that affects sheep and goats and is the most common form of

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs), which include Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in humans and Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). The Active Surveillance Plan for Scrapie, operating in the European Union since 2002, revealed that Scrapie was more prevalent than expected. In order to perform a preliminary evaluation of the incidence of this disease, the brainstems and cerebellums of 4822 small ruminants slaughtered in an Abattoir from central Portugal, were collected and sent for laboratory detection of TSEs. Overall, 8 cases of atypical Scrapie were detected in sheep. The detection rates (0,17%) in small ruminants aging over 18 months was low and revealed to be of the atypical form.

**Keywords:** Small Ruminants, Surveillance Scheme, EET.

### **Introdução**

Para assegurar a observância da regulamentação relativa à prevenção, controlo e erradicação de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis, é necessário efectuar a colheita de amostras de Sistema Nervoso Central em matadouro, durante o acto de Inspeção Sanitária, para proceder à realização de testes laboratoriais (Regulamento (CE) N.º 999/2001, com as alterações introduzidas pelos Regulamentos (CE) N.ºs 1248/2001 e 1492/2002). A implementação do Plano de Vigilância Activa do Scrapie na União Europeia, permitiu identificar casos de Scrapie atípico em Portugal. No âmbito deste plano de vigilância, é obrigatório proceder à recolha dos troncos cerebrais dos cadáveres de ovinos e caprinos com mais de 18 meses, quer ao nível dos matadouros, quer ao nível das explorações, com vista ao seu envio para o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, para serem submetidos a testes de diagnóstico de Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (Regulamentos (CE) N.º 36/2005, 253/2006; 162/2009 e 220/2009).

A aplicação do Plano de Vigilância Activa na União Europeia, desde 2002, permitiu determinar uma incidência de Scrapie superior ao esperado, bem como a identificação em vários países, de casos atípicos de Scrapie. As formas atípicas de Scrapie foram diagnosticadas pela primeira vez na Noruega em 1998 (Nor98) e, desde então, vários países europeus, incluindo Portugal, confirmaram a sua existência (Orge et al., 2004). O Scrapie é uma doença neurodegenerativa fatal que afecta ovelhas e cabras e é a forma mais comum do grupo das doenças designadas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (EET's), que inclui a doença de Creutzfeldt – Jakob dos

humanos (CJD) e a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) (Galo, 2000). O agente etiológico das EET's é o príão (Partícula proteinácea infecciosa - PrP) (Prusiner, 1998). A susceptibilidade à doença é dependente da composição genética do hospedeiro (Hamir, 2009).

O Scrapie é uma doença considerada endémica nos vários países da União Europeia e, apesar de ser reconhecida como doença há cerca de 250 anos (McGowan, 1922), a evolução do número de casos de Scrapie Atípico desde a implementação do Plano de Vigilância Activa (Regulamento (CE) N.º 999/2001) justifica o exame mais aprofundado ao sistema nervoso central de pequenos ruminantes e a realização de testes específicos de diagnóstico, com vista à sua detecção.

Em Portugal, apesar da realização dos Planos de Vigilância, a ambos os níveis, clínico e histopatológico, até à data ainda não tinham sido diagnosticados casos de Scrapie clássico (Orge *et al.*, 2004), isto é, em que se verificasse o quadro lesional microscópico ou ainda o perfil electroforético, de acordo com o descrito por Andréoletti *et al.*, (2000), por van Keulen *et al.*, (2000), por Ryder *et al.*, (2001), e por Orge, (2005). Em 2003, identificou-se pela primeira vez em Portugal uma forma atípica de Scrapie, semelhante ao perfil descrito para a Nor98 sem uma relação a um genótipo em particular e incluindo genótipos raramente associados com Scrapie (Orge *et al.*, 2004). Contudo, para que estes casos não passem sem detecção nos sistemas de inspecção sanitária, a vigilância atenta e a inspecção *post-mortem* do sistema nervoso central, com recolha dos troncos cerebrais para a realização de testes mais específicos, torna-se absolutamente fundamental. Assim, o objectivo deste trabalho consistiu no acompanhamento da inspecção sanitária de pequenos ruminantes, com especial enfoque na inspecção do sistema nervoso central e aprofundamento das técnicas de recolha do tronco cerebral.

### **Material e Métodos**

Durante o período de 6 meses, compreendido entre Janeiro e Junho de 2006, foi efectuado o acompanhamento da inspecção sanitária no matadouro UNIAGRI II, a 4822 pequenos ruminantes, 136 caprinos com mais de 18 meses de idade e 4686 ovinos com mais de 18 meses de idade, tendo sido dado especial enfoque à inspecção sanitária do sistema nervoso central de pequenos ruminantes e à técnica de colheita do tronco cerebral e cerebelo, a qual será descrita seguidamente.

#### *Técnica de colheita*

Aos ovinos e caprinos com mais de 18 meses admitidos ao abate foi feita cuidadosamente a ablação da cabeça, ao nível da articulação atlantooccipital (Fig. 1). As cabeças foram identificadas com o número interno de abate e dispostas em linha numa

mesa, com a mandíbula virada para cima e o Foramen Magnum dirigido para o operador (Fig. 2).



Figura 1. Ablação da cabeça.



Figura 2. Disposição das cabeças em linha, segundo o número de identificação interno de abate.

*Técnica de colheita do tronco cerebral e cerebello*

Em virtude de terem sido detectados casos de Scrapie Atípico em pequenos ruminantes em Portugal, é fundamental efectuar a recolha do tronco cerebral e do cerebello, uma vez que a PrPres apresenta maior deposição nessas regiões do sistema nervoso central (Orge et al., 2004).

Durante a recolha do tronco cerebral e cerebello, é extremamente importante usar material de protecção individual, nomeadamente bata, luvas descartáveis e máscara.

O tronco cerebral é extraído através do Foramen Magnum, por meio de um instrumento especialmente concebido para o efeito (Fig. 3). Após a introdução do instrumento de colheita no Foramen Magnum, entre a medula e as meninges, fazem-se ligeiras deslocações laterais, com o objectivo de libertar totalmente o tronco cerebral. De seguida, retira-se o instrumento de recolha de forma a extrair o tronco cerebral para o exterior (Fig. 4). Por fim introduz-se novamente o instrumento de recolha no Foramen Magnum e retiram-se duas porções de cerebello que serão colocadas no mesmo frasco.

Finda a colheita, a cabeça deve ser armazenada até ao conhecimento dos resultados laboratoriais do teste rápido. No caso do resultado do teste ser positivo, a respectiva cabeça, devidamente acondicionada, deve ser enviada para o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), que é o laboratório nacional de referência, onde se executam os testes de diagnóstico e confirmação das EET's (Regulamento (CE) N.º 162/2009).

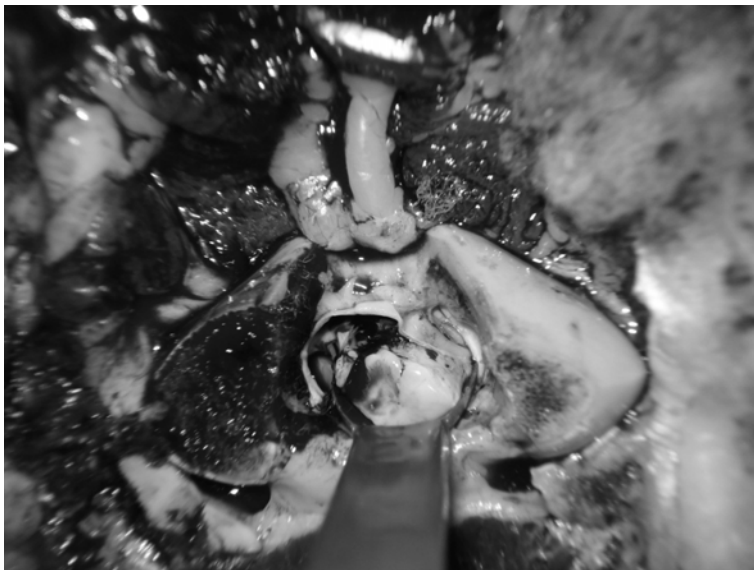


Figura 3. Colheita do tronco cerebral.



**Figura 4. Troncos cerebrais.**

#### *Divisão do tronco cerebral*

Após a colheita do tronco cerebral, efectua-se a secção longitudinal da amostra ao nível do sulco mediano com o auxílio da faca (Fig. 5).



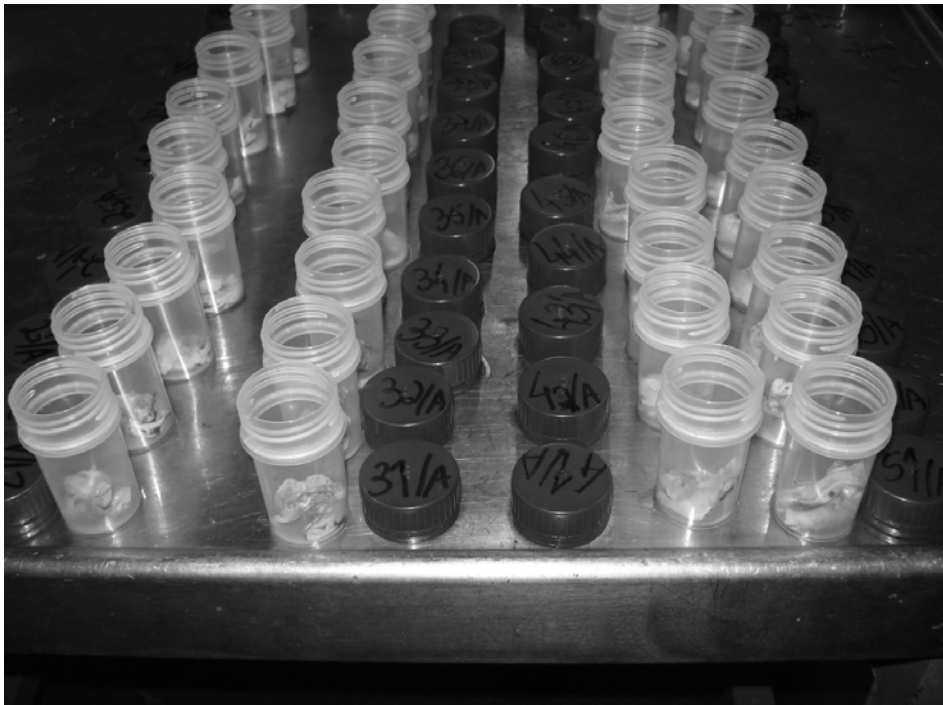
**Figura 5. Divisão do tronco cerebral.**

A divisão deve ser feita com o tronco sobre um vidro devidamente esterilizado, eliminando, deste modo, eventuais contaminações. É necessário fazer a divisão do tronco cerebral, visto que uma metade é utilizada no estado fresco, na realização do

teste rápido, e a outra metade é fixada com formol a 10%, para a realização de exames de confirmação histopatológicos e/ou imunohistoquímicos e/ou Western blot, quando o resultado do teste rápido for positivo ou inconclusivo.

*Envio das amostras ao laboratório*

Os frascos (Fig.6) devem ser rotulados no corpo do frasco (Fig.7). No rótulo (Fig.8) deve constar obrigatoriamente o número do brinco do animal, pertencente ao Sistema de Identificação Animal (SIA), a data do abate, o número interno de abate e o nome ou iniciais do Inspector Sanitário que procedeu à recolha da amostra para o laboratório.



**Figura 6. Troncos cerebrais nos respectivos frascos.**

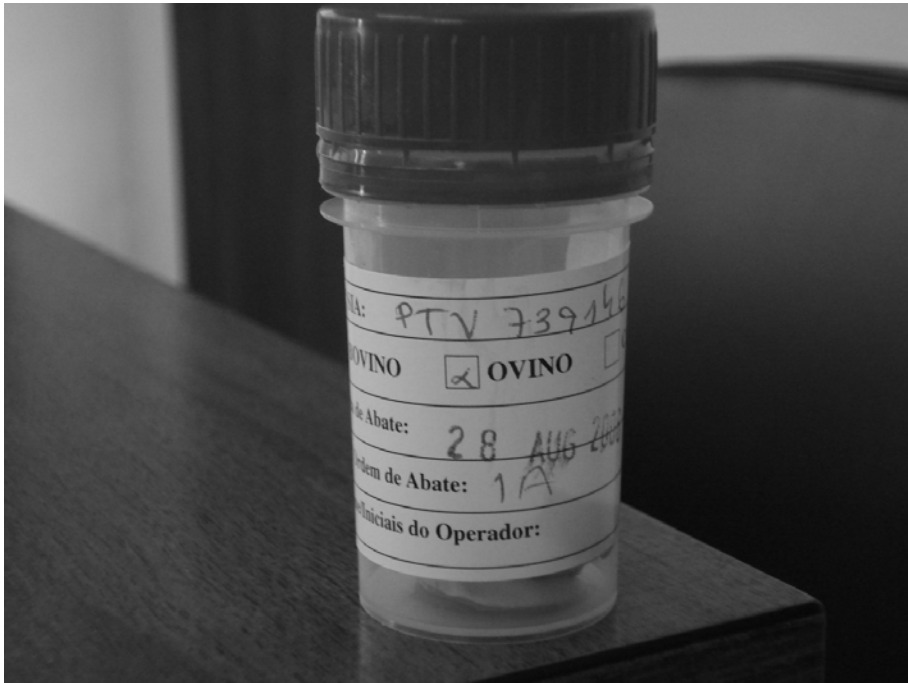


Figura 7. Frasco com o respectivo rótulo.

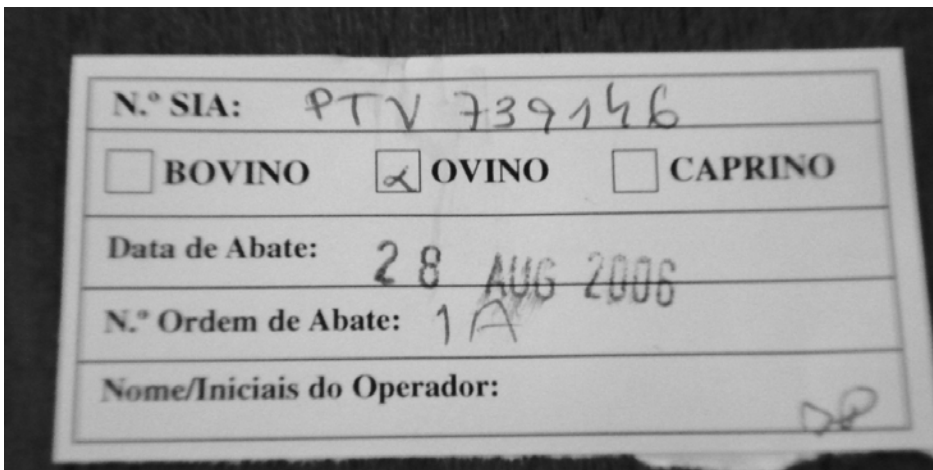


Figura 8. Rótulo utilizado na identificação das amostras.

As amostras devem ser devidamente acondicionadas (Fig.9) numa mala isotérmica (Fig.10). As respectivas folhas de requisição de análises são introduzidas no invólucro de plástico transparente na parte superior da mala isotérmica. Na folha de



requisição das amostras é escrito o número do selo que se utiliza no fecho da mala isotérmica, de forma legível, sob pena de rejeição das amostras pelo LNIV.



Figura 9. Amostras num suporte de esferovite.



Figura 10. Mala isotérmica com as amostras.

Posteriormente, o matadouro é responsável pelo transporte e entrega das amostras no gabinete de recepção de amostras do laboratório.

### **Resultados**

No período de realização deste trabalho, foram efectuadas 4822 colheitas de troncos cerebrais no matadouro UNIAGRI II, sendo que 4686 amostras eram provenientes de ovinos e 136 amostras de caprinos com mais de 18 meses para que fosse efectuado o rastreio de EET's.

Dos animais rastreados, verificou-se que, em cada mês do período deste estudo, um caso foi detectado como positivo ao teste rápido TeSeE Bio-Rad e, em Abril, foram detectados 3 casos (Fig. 11), totalizando 8 (0,17%) os casos cujo resultado foi positivo ao teste rápido. Posteriormente, estes 8 casos foram submetidos a exames complementares de diagnóstico (Western blot, Imunohistoquímicos, Histopatológicos).

Em relação à técnica Western blot, verificou-se que estes 8 casos apresentaram resultado positivo. Em relação aos exames histopatológicos, verificaram-se 4 casos cujos resultados foram inconclusivos. Os restantes casos apresentaram resultado negativo ao exame histopatológico.

Dos 8 casos submetidos ao exame imunohistoquímico, verificou-se que 2 casos eram positivos, 3 negativos e 3 inconclusivos.

Assim, e de acordo com o resultado dos exames realizados pelo LNIV para detectar a PrPres, registaram-se 8 casos de Scrapie atípico nos ovinos abatidos no período compreendido entre Janeiro e Junho de 2006, uma vez que se verificou que todos os casos foram positivos ao exame Western blot e, por isso, confirmados como positivos, apesar de só 2 casos terem obtido resultado positivo no exame imunohistoquímico e nenhum ter obtido resultado positivo no exame histopatológico (Tabela 1).

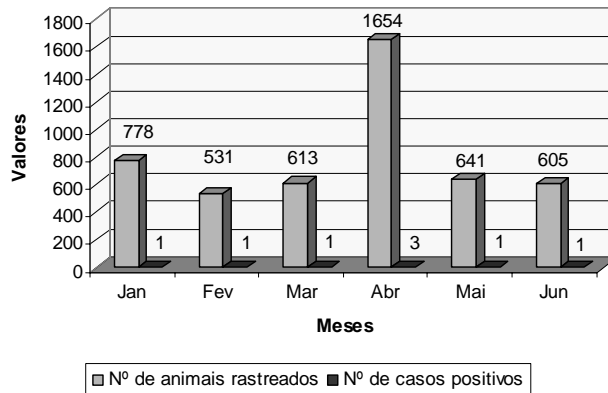


Figura 11. Relação entre o número de animais rastreados e o número de casos positivos ao teste rápido.

Tabela 1. Resultados dos exames Western immunoblotting (WB), imunohistoquímico (IHC) e histopatológico (HP) referentes aos ovinos. + Positivo; – Negativo; Inc.- Inconclusivo.

| Meses     | Casos de Scrapie | Testes efectuados |      |      |
|-----------|------------------|-------------------|------|------|
|           |                  | WB                | IHC  | HP   |
| Janeiro   | 1                | +                 | +    | Inc. |
| Fevereiro | 1                | +                 | -    | -    |
| Março     | 1                | +                 | -    | -    |
| Abril     | 3                | +                 | +    | Inc. |
|           |                  | +                 | -    | -    |
| Maio      | 1                | +                 | Inc. | Inc. |
|           |                  | +                 | Inc. | -    |
| Junho     | 1                | +                 | Inc. | Inc. |

## Discussão

Apesar do número de casos positivos registados no matadouro UNIAGRI II ter sido baixo, em termos percentuais, comprovou-se que é fundamental que, no acto de inspecção sanitária, se dê especial atenção à colheita do tronco cerebral e do cerebelo em pequenos ruminantes com mais de 18 meses de idade e se cumpram cuidadosamente as normas de envio das amostras ao laboratório, uma vez que se trata de despistar um grupo de doenças de risco elevado que justificam o esforço e custo das medidas implementadas, de modo a impedir a entrada nem que seja de um único caso positivo no circuito alimentar, para prevenir a exposição humana ao agente infeccioso. Como tal, a técnica de colheita deve ser executada de forma adequada, com o intuito de obter uma boa qualidade da amostra, que permita garantir eficácia na realização dos testes de diagnóstico que se seguem, bem como uma correcta interpretação dos resultados das análises no laboratório.

### Conclusão

1ª A percentagem de casos positivos (0,17%) detectados no período de realização deste estudo foi baixa em pequenos ruminantes com mais de 18 meses e, segundo os resultados laboratoriais, enquadraram-se no perfil de Scrapie atípico.

2ª Não se registou nenhum caso de Scrapie atípico em caprinos com mais de 18 meses de idade.

3ª A inspeção meticulosa do sistema nervoso central e colheita do tronco cerebral e cerebelo em pequenos ruminantes nos matadouros é crucial para evitar que haja casos de EET's a entrar na cadeia alimentar, prevenindo a exposição humana ao agente infeccioso.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉOLETTI, O.; BERTHON, P.; MARC, D.; SARRADIN, P.; GROSCLAUDE, J.; van KEULEN, L.; SCHELCHER, F.; ELSEN, J. M. & LANTIER, F. (2000). Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*. 81. Pp. 3115–3126.
- GALO, A. (2000). Nota histórica sobre as Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis animais. In COSTA, J.; DIAS, M.; GALO, A.; LIMA, C.; LOUZÃ, A.; PIMENTEL, J.; RAMOS, A.; REIS, M. & SINOGAS, C. (Eds). *Manual BSE – Aspectos científicos e regulamentares das Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis*. Lisboa, Europress: 9-13.
- HAMIR, A. (2009). Characterization of a US sheep scrapie isolate with short incubation time. *Veterinary Pathology*. 6. Pp. 1205-1212.
- MCGOWAN, J. P. (1922). Scrapie in sheep. *Scottish Journal of Agriculture*. 5. Pp. 365–375.
- ORGE, L.; GALO, A.; MACHADO, C.; LIMA, C.; OCHOA, C.; SILVA, J.; RAMOS, M. & SIMAS, J. (2004). Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology*. 85. Pp. 3487-3491.
- ORGE L (2005). *Caracterização da estirpe da BSE em Portugal e estudo da susceptibilidade genética dos ovinos às TSEs*. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real. Pp. 7-30; 33-71; 75; 181-217.
- PRUSINER, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95. Pp. 13363-13383.
- REGULAMENTO (CE) N.º 999/2001. Regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 31.5.2001. L147. Pp. 1-40.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1248/2001. Altera os anexos III, X e XI do Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho relativamente à vigilância epidemiológica e aos testes de detecção de encefalopatias espongiformes transmissíveis. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 27.6.2001. L173. Pp. 1-12.
- REGULAMENTO (CE) N.º 1492/2002. Altera o Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere a medidas de erradicação de encefalopatias espongiformes transmissíveis em bovinos, ovinos e caprinos, ao comércio e à importação de sêmen e embriões de ovinos e caprinos, bem como a matérias de risco especificadas. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 24.8.2004. L274. Pp. 1-6.
- REGULAMENTO (CE) N.º 36/2005. Altera os anexos III e X do Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere à vigilância epidemiológica de encefalopatias espongiformes transmissíveis em bovinos, ovinos e caprinos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 13.1.2005. L10. Pp. 8-16.

- REGULAMENTO (CE) N.º 253/2006. Altera o Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos testes rápidos e às medidas de erradicação das EET em ovinos e caprinos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 15.2.2006. L44. Pp. 9-12.
- REGULAMENTO (CE) N.º 162/2009. Altera os Anexos III e X do Regulamento (CE) N.º 999/2001 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 27.2.2009. L55. Pp. 11-16.
- REGULAMENTO (CE) N.º 220/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 11 de Março de 2009, que altera o Regulamento (CE) N.º 999/2001, que estabelece regras para a prevenção, o controlo e a erradicação de determinadas encefalopatias espongiformes transmissíveis, no que diz respeito às competências de execução atribuídas à Comissão. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. 31.3.2009. L87. Pp. 155-156.
- RYDER SJ, Spencer YI, BELLERBY PJ, March SA. 2001. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Veterinary Record*. 148. Pp. 7–13.
- van KEULEN, L. J.; SCHREUDER, B. E.; MELOEN, R. H.; POELEN-van den BERG, M.; MOOIJ-HARKES, G.; VROMANS M. E. & LANGEVELD, J. P. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*. 32. Pp. 299–308.