



O TREMOR EPIZOÓTICO EM CAPRINOS: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO, VIGILÂNCIA E PREVENÇÃO

O tremor epizootico (TE), também conhecido por scrapie na língua inglesa, é uma doença neurodegenerativa fatal, de declaração obrigatória, que afeta ovinos e caprinos. Pertence ao grupo das encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), também designadas doenças priónicas por estarem associadas à infeção por priões. Embora já existam estudos sobre EET em caprinos, incluindo os aspetos relacionados com a resistência genética ao TE, em vários países europeus, decorre atualmente um trabalho semelhante na população caprina portuguesa. Este artigo descreve o quadro clínico e a situação epidemiológica do TE, bem como o seu controlo em caprinos no nosso país, incluindo a caracterização das duas formas da doença, a sua transmissão e os fatores genéticos que influenciam a resistência à mesma. Por fim, enfatizamos os objetivos do projeto de investigação que contribuirão para um melhor conhecimento e controlo destas doenças.

Natália Faria Campbell^{1,2}, Renata Carvalho³, Vera Silva¹, Paula Tavares¹, Fátima S. Silva¹, Neuza Bacalhau¹, Inês Carolino¹, Nuno Carolino¹, Gabrielle Vaccari⁴, Giuseppe Ru⁵ e Leonor Orge^{1,6}

¹ Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



² Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development (MED)



³ Direção-Geral de Alimentação e Veterinária



⁴ Istituto Superiore di Sanità, Itália



⁵ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Itália



⁶ Animal and Veterinary Research Centre (CECAV)



O que é o TE?

O TE é uma doença neurodegenerativa fatal que ocorre naturalmente em pequenos ruminantes. Faz parte do grupo de doenças denominadas encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET). Este grupo inclui outras doenças bem conhecidas

como a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) e a doença de *Creutzfeldt-Jakob* (DCJ) que afeta pessoas. Existem duas formas conhecidas de TE – a clássica e a atípica, também conhecida como Nor98, por ter sido identificada pela primeira vez na Noruega, em 1998 (Benestad *et al.*, 2003).

A primeira descrição de TE clássico surgiu em 1732 em ovelhas no Reino Unido (McGowan, 1922), tendo primeiro relato de um caso de infecção natural de TE em caprinos surgido mais de 300 anos depois, em França (Chelle, 1942). Desde então, em muitos países, o TE clássico tornou-se enzoótico nas populações de pequenos ruminantes.

Habitualmente, os primeiros sinais clínicos do TE são alterações no comportamento e na coordenação motora. À medida que a doença progride, surgem outras manifestações clínicas como tremores, resposta exagerada a estímulos sensoriais e caquexia, ocorrendo ainda frequentemente um agravamento da incoordenação motora (Healy *et al.*, 2003). A denominação em inglês da doença *scrapie*, reflete outro sinal clínico muito frequentemente observado, o “raspar” contra cercas ou outras superfícies ásperas para aliviar o prurido que os animais manifestam quando afetados pela forma clássica. No Quadro 1 comparam-se as características das duas formas da doença.

Ao contrário da EEB, o TE não é considerado zoonótico e, na forma clássica, é transmitido horizontalmente entre cabras e ovelhas, apresentando um longo período de incubação, usualmente de um a

Quadro 1 – Principais características do TE clássico e do TE atípico

	TE clássico	TE atípico (Nor98)
Ocorrência	Pequenos ruminantes entre 2 e 5 anos de idade. Vários animais afetados no rebanho. Associado a movimentação animal.	Pequenos ruminantes com idade superior a 5 anos (média 6,5 anos). Um ou dois animais afetados por rebanho. Movimentação animal não é considerada fator de risco.
Transmissão	Ovelha para o borrego antes e/ou após o parto (placenta; leite ou do colostro). Transmissão horizontal (placentas nas pastagens).	Ainda não conhecida, possivelmente uma doença espontânea ou fracamente transmitida entre animais.
Sinais Clínicos	Hiperexcitabilidade, associada à progressiva incoordenação dos membros pélvicos, tremores e prurido. Nos caprinos é pouco frequente a fricção contra objetos estranhos, pois utilizam os cornos para se coçarem.	Isolamento, nervosismo, apatia, olhar fixo. Alterações da marcha com incoordenação, tremores. Perda de condição corporal.

cinco anos. A morte geralmente ocorre entre um a seis meses após a deteção da doença (Collinge *et al.*, 2007). No entanto, o TE clássico poderá ter estado na origem da EEB (Wilesmith *et al.*, 1988) que é zoonótica, sendo a causa da variante da doença de *Creutzfeldt-Jakob* (vCJD) em humanos (Bruce *et al.*, 1997). Além disso, a transmissão experimental do TE atípico a murganhos transgénicos originou uma forma de doença semelhante à EEB (Huor *et al.*, 2019). Tendo em conta esta situação, a vigilância do TE pode ser também importante para a salvaguarda da saúde pública.

As cabras são frequentemente criadas em rebanhos mistos com ovelhas e podem servir como reservatório de TE. Além disso, foram já identificados dois caprinos infetados naturalmente com EEB (EFSA, 2017). A transmissão do TE clássico pode ser horizontal e vertical. Os priões são frequentemente transmitidos horizontalmente através do contacto com a placenta ou fluidos placentários de animais infetados, quer diretamente, quer indiretamente devido à contaminação ambiental causada pela presença deste material nas pastagens. A transmissão vertical, ou materna, ocorre geralmente através da ingestão de leite ou colostro ou por transferência intrauterina. Há também algumas evidências de que os priões podem ser transmitidos através de lesões cutâneas ou por aerossóis (Acín *et al.*, 2021). Já a transmissão do TE atípico, ainda não é conhecida, mas é possível que seja uma doença espontânea ou fracamente transmitida entre animais.

Embora por vezes bem-sucedida (Konold *et al.*, 2020), a descontaminação de priões é particularmente difícil, nomeadamente em explorações agropecuárias e outras instalações como laboratórios e hospitais ou clínicas veterinárias. O método mais fiável é a incineração.

Por outro lado, a legislação atual prevê medidas rigorosas para o controlo e erradicação do TE clássico, as quais incluem a eliminação total ou parcial dos rebanhos afetados, bem como restrições à movimentação animal e ao repovoamento das explorações atingidas [Regulamento (CE) n.º 999/2001 e posteriores modificações], resultando em graves prejuízos económicos para a produção.

Prevalência

O TE existe na Europa há centenas de anos, embora os primeiros casos em Portugal tenham sido detetados apenas no início deste século. Como Estado-Membro (EM) da União Europeia (UE), Portugal dispõe de um programa de vigilância e controlo do TE, desde a implementação da vigilância ativa em 2002. Este programa veio permitir a monitorização e a gestão da doença em toda a UE, incluindo Portugal. Em 2023, nos 27 Estados-Membros, foram testados 284 686 ovinos e 102 646 caprinos, tendo-se registado 538 casos de TE em ovinos (462 forma clássica e 76 forma atípica) e 183 em caprinos (176 forma clássica e sete forma atípica), revelando uma prevalência, em ambas as espécies, de pouco menos de 0,002. Em contraste com outros países europeus, onde o TE clássico é enzoótico, em Portugal predomina o TE atípico (Orge *et al.*, 2010). Entre 2002 e 2023, em caprinos, Portugal registou mais casos de TE atípico (16 portugueses e 6 importados de Espanha) do que de clássico (um), (EFSA 2024) (Figura 1).

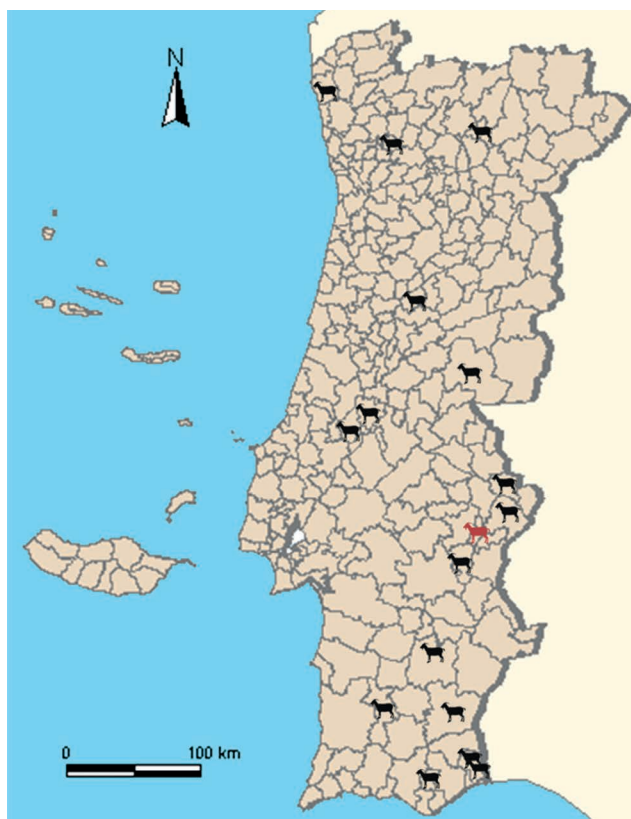


Figura 1 – Distribuição geográfica de TE em Portugal (🐐 – TE atípico; 🐐 – TE clássico).

Etiologia e genética

O agente etiológico do TE é uma partícula infecciosa de natureza proteica ou “prião”. Ao contrário dos outros agentes infecciosos (por exemplo, vírus, bactérias, parasitas, entre outros), os priões não contêm ácidos nucleicos (ADN, ARN). O aparecimento do TE deve-se à conversão estrutural da forma normal de uma proteína existente nas células do animal, a proteína priônica (PrP^c), codificada pelo gene PRNP, numa forma patogénica malconformada (PrP^{Sc}). Esta conversão resulta na acumulação progressiva de PrP^{Sc} no sistema nervoso central (SNC), principalmente no encéfalo, sendo responsável pelo aparecimento de vacúolos característicos, originando lesões de aparência esponjosa, e levando à morte do animal afetado. A presença de PrP celular, ao servir como modelo para a conversão para PrP^{Sc}, é o fator principal para o aparecimento do TE. Tal foi demonstrado por experiências envolvendo murghanos geneticamente modificados, sem o gene PRNP, nos quais a infeção por priões não resulta em doença (Büeler, 1993; Steele *et al.*, 2007).

Os focos de TE clássico têm sido controlados principalmente através do abate e eliminação de animais dos rebanhos afetados, limpeza e descontaminação das instalações agrícolas, seguidos de repovoamento de acordo com determinadas regras, previstas na legislação em vigor. No entanto, este é um processo dispendioso pelo que programas de criação para seleção de resistência genética ao TE clássico podem ser uma estratégia mais eficaz para o controlo desta doença.

Sabe-se que diversas variantes do gene PRNP, dependentes da presença de determinados componentes genéticos, estão associados à resistência à doença e a períodos de incubação prolongados. Por exemplo, caprinos com o alelo PRNP K222 mostraram ser resistentes ao TE clássico em várias raças de alguns países europeus (Goldman *et al.*, 2016), sendo possível que tal, também, se aplique ao efetivo português.

Suscetibilidade genética

Estudos efetuados em várias raças de caprinos identificaram diferentes alelos PRNP associados a uma maior resistência ao TE clássico (EFSA, 2017; Tor-

ricelli *et al.*, 2021). Como as variantes, associadas à resistência a esta doença, do gene PRNP dos ovinos eram já conhecidas, diversos países europeus implementaram programas de criação tendo em vista a seleção de animais resistentes, de modo a reduzir a incidência de genótipos suscetíveis ao TE clássico, prevenindo assim o aparecimento da doença. Um programa de criação semelhante em caprinos poderia potenciar a resistência ao TE clássico nesta população, através da seleção de animais reprodutores resistentes. No entanto, para que tal programa de criação para a resistência seja bem-sucedido, terá de ser acautelada a preservação da diversidade genética e das raças autóctones de caprinos.

O PRNP caprino é altamente variável e específico de cada raça. Os dados disponíveis sobre a frequência e distribuição dos alelos PRNP que conferem resistência ao TE clássico nesta espécie são limitados, sendo ainda mais escassos para a forma atípica da doença. Efetivamente, entre os EM da UE, menos de 10% das raças foram estudadas no que se refere a este gene, num estudo que abrangeu apenas alguns EM (EFSA, 2017). Além disso, os dados recolhidos num determinado país, relativos à sua população caprina, não se aplicam necessariamente a outras áreas geográficas (Vitale *et al.*, 2016; Migliore *et al.*, 2020).

Surpreendentemente, descobriu-se que uma raça de cabras leiteiras norueguesas é naturalmente desprovida de PrP^c sendo, portanto, inerentemente resistente ao TE (Benestad *et al.*, 2012; Salvesen *et al.*, 2020). Até agora, estudos genéticos revelaram a existência de 50 variantes ou polimorfismos no PRNP caprino, incluindo mutações silenciosas e um genótipo PRNP contendo três repetições octapeptídicas, em vez das cinco habituais (EFSA, 2017; Torricelli *et al.*, 2021). Várias mutações codificantes do PRNP caprino foram associadas à resistência ao TE clássico: nomeadamente, os alelos S127, M142, R143, D145, D146, S146, H154, Q211 e K222. Assim, com base em evidências experimentais, a UE considerou que os alelos K222, D146 e S146 podem conferir resistência, podendo, portanto, ser utilizados em programas de seleção genética para a prevenção e controlo do TE clássico em caprinos (Regulamento UE 772/2020, que altera o Regulamento UE 999/2001) (Figura 2).

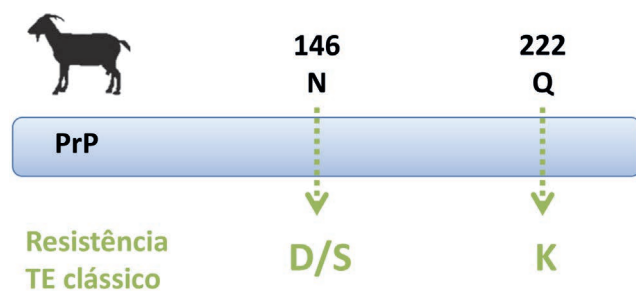


Figura 2 – PRNP caprino com os polimorfismos associados à resistência ao TE clássico.

O K222 parece ser o alelo mais promissor. No entanto, as frequências destes alelos associados à resistência são baixas (<10%) e, tal como anteriormente mencionado, variam entre os Estados-Membros. Por este motivo, a seleção para estes alelos pode ter um impacto negativo na diversidade genética das raças de caprinos, especialmente naquelas com populações pequenas. Além disso, devido à variação geográfica nas suas frequências, cada EM deverá adaptar o seu programa de criação tendo em vista a seleção para a resistência de acordo com as características específicas da sua população.

É possível saber se um caprino é sensível ou resistente, através de um teste efetuado a partir do seu ADN. Este teste chama-se “genotipagem” e com ele obtém-se uma caracterização do “genótipo” do animal, através da determinação dos ácidos aminados presentes na proteína priónica.

As características genéticas do efetivo caprino português (raças autóctones e raças exóticas mais utilizadas) não são ainda conhecidas. A genotipagem desta população permitir-nos-á conhecer a frequência das variantes do gene PRNP associadas à resistência e à suscetibilidade ao TE clássico e conhecer melhor as características genéticas associadas à forma atípica.

Vigilância do TE

Tal como os restantes EM da UE, Portugal implementa anualmente um Programa de Vigilância, Controlo e Erradicação do TE, que inclui uma componente de vigilância passiva (testagem de animais com sinais clínicos neurológicos sugestivos de TE) e uma componente de vigilância ativa baseada na testagem de uma amostra de animais abatidos para

consumo humano (apenas ovinos) e de animais encontrados mortos na exploração (ovinos e caprinos). Este Programa tem sido ajustado de acordo com a evolução epidemiológica das doenças e dos conhecimentos científicos (Reg. CE n.º 999/2001 e suas posteriores alterações). Como não existe um teste laboratorial validado para o diagnóstico em vida das EET, a deteção destas doenças baseia-se em exames laboratoriais *post-mortem* de amostras do sistema nervoso central. O teste de rastreio consiste na deteção do prião em amostras de tronco cerebral pelo método imunoenzimático de ELISA (os designados “Testes Rápidos”) e é efetuada em laboratórios oficiais – INIAV (Oeiras e Vairão), Laboratório Regional de Veterinária e Segurança Alimentar da Madeira (LRVSA-Funchal) e Laboratório Regional de Veterinária dos Açores (LRVA-Angra do Heroísmo) (DGAV, 2018a). Qualquer resultado positivo ou suspeito ao “teste rápido” tem de ser sujeito a testes confirmatórios que são realizados no INIAV, o qual é o Laboratório Nacional de Referência para as EET.

Seleção genética em caprinos para resistência ao TE clássico

Os efetivos classificados como sendo de risco negligenciável para TE clássico são valorizados, uma vez que, para efeitos de reprodução, na UE, apenas podem circular entre os vários EM animais provenientes de rebanhos com este estatuto sanitário ou portadores de genótipos resistentes. No que respeita às exportações para países terceiros, também o Código Sanitário dos Animais Terrestres da Organização Mundial para a Saúde Animal recomenda que apenas sejam importados, para efeitos de reprodução, animais provenientes de países, zonas ou estabelecimentos “livres” de TE, sendo que o conceito de “livre” é idêntico ao de risco negligenciável previsto no Regulamento (CE) n.º 999/2001. Até à data, Portugal registou apenas um caso de TE clássico em caprinos e nesta espécie foram confirmados apenas alguns casos da forma atípica, ao passo que em ovinos detetou-se um elevado número de casos, sobretudo atípicos. Assim, o conhecimento da composição genética da população portuguesa de caprinos no que se refere ao gene

PRNP é importante, uma vez que estes animais são frequentemente mantidos em rebanhos com ovinos e podem servir como reservatórios de priões.

Não havendo dados sobre a diversidade do PRNP caprino em Portugal, nomeadamente quanto às frequências dos alelos resistentes na população portuguesa, o Projeto PeXPTPrionGoat (2023.14526.PEX, <https://doi.org/10.54499/2023.14526.PEX>) procura colmatar estas lacunas. Isto é particularmente importante tendo em conta a recente identificação do primeiro caso nacional de TE clássico nesta espécie. Este projeto permitirá determinar as frequências dos polimorfismos do gene PRNP em seis raças caprinas portuguesas (Algarvia, Bravia, Charnequeira, Preta de Montesinho, Serpentina e Serrana), em três raças exóticas (Saanen, Alpine e Murciana Granadina), em caprinos negativos para EET, testados no âmbito da vigilância ativa, e em todos os casos detetados. A amostragem inclui uma representação proporcional da população caprina autóctone com base nos registos nacionais das respetivas raças, na sua distribuição geográfica e na dimensão dos respetivos efetivos. Por seu lado, o único caso caprino de TE clássico era portador do genótipo NN146 QQ222, não possuindo qualquer dos alelos resistentes (D146, S146 ou K222). Em resumo, os objetivos deste projeto são:

- Definir a frequência dos alelos do gene PRNP nas raças portuguesas, raças exóticas e na população caprina em geral;
- Identificar raças de caprinos criadas em Portugal resistentes ao TE;
- e
- Determinar o genótipo completo do PRNP nos caprinos diagnosticados com TSE.

Este novo conhecimento será fundamental para a definição de estratégias de criação tendo em vista a seleção para a resistência nesta espécie, complementando assim as medidas de controlo da doença e promovendo a prevenção da mesma. A identificação de genótipos PRNP que possam conferir resistência aos caprinos, relativamente às doenças priónicas, não é apenas relevante para Portugal, constitui, também, um contributo importante para o aprofundamento do conhecimento científico deste tema. ☺

Bibliografia

- Acín et al. (2021). *Animals* (Basel), **11**(3):691. DOI: 10.3390/ani11030691.
- Benestad et al. (2003). *Vet Rec.*, **153**(7):202–8. DOI: 10.1136/vr.153.7.202. PMID: 12956297.
- Benestad et al. (2012). *Vet Res*, **43**(1):87. DOI: 10.1186/1297-9716-43-87.
- Bruce et al. (1997). *Nature*, **389**:498–501.
- Büeler et al. (1993). *Cell*, **73**:1339–1347.
- Chelle (1942). *Bull Acad Vét Fr*, **15**:294–295.
- Collinge et al. (2007). *Science*, **318**:930–936.
- EFSA (2017). *EFSA Journal*, **15**(8):4962. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4962.
- EFSA (2024). *EFSA Journal*, **22**: e9097. DOI: 10.2903/j.efsa.2024.9097.
- Goldman et al. (2016). *Vet Rec*, **178**(7):168. DOI: 10.1136/vr.103521.
- Healy et al. (2003). *J Vet Intern Med*, **17**:908–916.
- Huor et al., (2019). *Proc Natl Acad Sci USA*, **116**:26853–26862.
- Konold et al. (2020). *Front Bioeng Biotechnol*, **8**:164. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00164.
- Konold et al. (2020). *Front Vet Sci*, **7**:585. DOI: 10.3389/fvets.2020.00585.
- McGowan (1922). *J Agric*. **5**:365–375.
- Migliore et al. (2020). *Front Vet Sci*, **7**:581969. DOI: 10.3389/fvets.2020.581969.
- Orge et al. (2010). *J Gen Virol*, **91**:1646–1650. DOI: 10.1099/vir.0.018879-0.
- Pan et al. (1993). *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**:10962–10966. DOI: 10.1073/pnas.90.23.10962.
- Salvesen et al. (2020). *Vet Res*, **51**:1. DOI: 10.1186/s13567-019-0731-2.
- Steele et al. (2007). *Prion*, **1**(2):83–93. DOI: 10.4161/pri.1.2.4346.
- Torricelli et al. (2021). *Animals*, **11**:333. DOI: 10.3390/ani11020333.
- Wilesmith et al. (1988). *Vet Rec*, **123**:638–644.
- Vitale et al. (2016). *BMC Vet Res*, **12**:141. DOI: 10.1186/s12917-016-0766-9.

