

GENOTIPI GENA ZA PRIONSKI PROTEIN PRI OVCAH Z ATIPIČNIM PRASKAVCEM V SLOVENIJI

Jelka Zabavnik Piano^{1*}, Marko Cotman¹, Ivan Ambrožič², Polona Juntos³

¹Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, ²Sektor za hrano, krmo in zdravila, Uprava Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin, ³Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

jelka.zabavnik@vf.uni-lj.si

Atipični praskavec je oblika prenosljive spongiformne encefalopatije (TSE), ki se pojavlja v večini evropskih držav in predstavlja vedno večji delež ugotovljenih primerov praskavca pri ovcah. V Sloveniji je bil atipični praskavec pri ovcah prvič ugotovljen leta 2010, po uvedbi metode, ki je bila dovolj občutljiva, da je zaznala prione, ki so značilni za atipični praskavec. Od začetka leta 2010 do marca 2016 smo na TSE testirali 8633 ovac in potrdili 10 primerov atipičnega praskavca. Dovzetnost na klasično in atipično obliko praskavca je, vsaj deloma, genetsko pogojena. Znano je, da so ovce z genotipom gena za prionski protein (*Prnp*) ARR/ARR najbolj odporne na razvoj klasične oblike praskavca, ovce z genotipom VRQ/VRQ so najbolj dovzetne. Obratno se atipični praskavec pogosto pojavlja pri ovcah, ki imajo alel ARR in le redko pri ovcah z alelom VRQ, na razvoj bolezni pa pomembno vpliva tudi aminokislina na položaju 141 prionskega proteina (fenilalanin ali levicin). Primerjava genotipov ovac z atipičnim praskavcem z ugotovljenimi genotipi 1680 naključno izbranih poginulih ovac je pokazala, da se atipični praskavec ne pojavlja pri ovcah z aleli VLRQ in ALRH. Ugotovljen je bil pri ovcah z alelom AFRQ, čeprav je v Sloveniji delež ovac s tem alelom majhen (1,14 % vzorca ovac), in pri ovcah z alelom ALHQ ter le pri manjšem deležu ovac z alelom ALRR in ALRQ. Alel ALHQ se v Sloveniji pojavlja pri 6,5 % ovac, zato lahko pričakujemo, da se bo atipični praskavec še pojavljal v naši populaciji ovac.

Ključne besede: prenosljive spongiformne encefalopatije; atipični praskavec; genotip; gen za prionski protein

Uvod

Praskavec je bolezen drobnice, ki spada v skupino neozdravljivih prenosljivih spongiformnih encefalopatij (TSE) ali prionskih bolezni, pri katerih nastajajo v celicah spremenjeni patološki prionski proteini - prioni (PrP^{Sc}), se v njih kopičijo in povzročajo značilne spremembe v živčnem sistemu (1). Prionske bolezni so infektivne, sporadične in/ali dedno pogojene (3). Klasična oblika praskavca je tipični predstavnik prionske bolezni, potrebna je infekcija s PrP^{Sc}, na dovzetnost pa pomembno vpliva genotip *Prnp*. Klasični praskavec se pojavlja pri drobnici v Evropi že več kot dve stoletji. Atipični praskavec je bil prvič ugotovljen leta 1998 na Norveškem in ga poznamo kot Nor98 (2), sedaj ga ugotavljajo v večini evropskih držav in zaradi uspešnega zatiranja klasičnega praskavca predstavlja vedno večji delež primerov praskavca pri ovcah (2, 3). Etiološki dejavniki pri razvoju atipičnega praskavca še niso popolnoma raziskani. Gre za sporadično, verjetno spontano obliko bolezni, na katero tudi vpliva oblika genotipa *Prnp*. Ugotovljen je vpliv aminokislina

fenilalanina (F) na položaju 141 prionskega proteina, ki je pogost pri ovcah z atipičnim praskavcem. Atipični praskavec se pogosto pojavlja pri ovcah, ki imajo alel ARR in AHQ in le redko pri ovcah z alelom VRQ (2, 3, 4).

Poznavanje genotipov lahko omogoča predvidevanje pojava atipičnega praskavca, zato smo v naši študiji želeli ugotoviti genotipe *Prnp* pri ovcah v Sloveniji in jih primerjati z genotipi ovc, kjer je bil ugotovljen atipični praskavec.

Material in metode

Za izolacijo DNK in določanje genotipa *Prnp* na kodonih 136, 141, 154 in 171 smo uporabljali vzorce mišic ovac, ki smo jih pobrali iz dveh skupin poginjenih ovac: 1) Ovce po programu monitoringa, ki je bil predpisan in financiran z letno odredbo Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in se je izvajal od leta 2009. Te vzorce mišic se je izbiralo naključno pri poginulih ovcah, vzorce so odvzeli patologi Nacionalnega veterinarskega inštituta, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani (VF, UL). Letni monitoring je zajemal od 100 do 130 živali, skupaj smo od leta 2009 določili genotip pri 1680 naključno izbranih poginjenih ovcah; 2) Vzorce mišic ovac, ki so v hitrem postmortalnem testu z ELISA metodo HerdChek BSE Scrapie Antigen (IDEXX Laboratories) reagirale pozitivno na TSE in smo jih prejeli iz Laboratorija za patologijo in TSE, VF, UL. Od začetka leta 2010 do konca marca 2016 smo določili genotip pri 16 ovcah, ki so bile sumljive na TSE, pri desetih med njimi (10/16) pa je bil potrjen atipični praskavec (od 8633 na TSE pregledanih vzorcev).

Pri vseh vzorcih smo standardno odvzeli vzorec zunanjih žvečkavke (maseter), ki smo jo s skalpelom razrezali na majhne koščke in jih homogenizirali v pufru s homogenizatorjem Fasth (ConsulTH). Iz približno 3 mm³ mišičnega tkiva smo izolirali genomsko DNA z reagentom Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Genotipe smo določali s testom ločevanja alelov z verižno reakcijo v realnem času. Reakcijo smo izvajali v petih epruvetah (po ena epruveta za allele na položajih 136, 141, 154 in dve epruveti za položaj 171) z reagenti Taqman Genotyping Master Mix or Taqman Universal Master Mix – Applied Biosystems) na aparaturi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

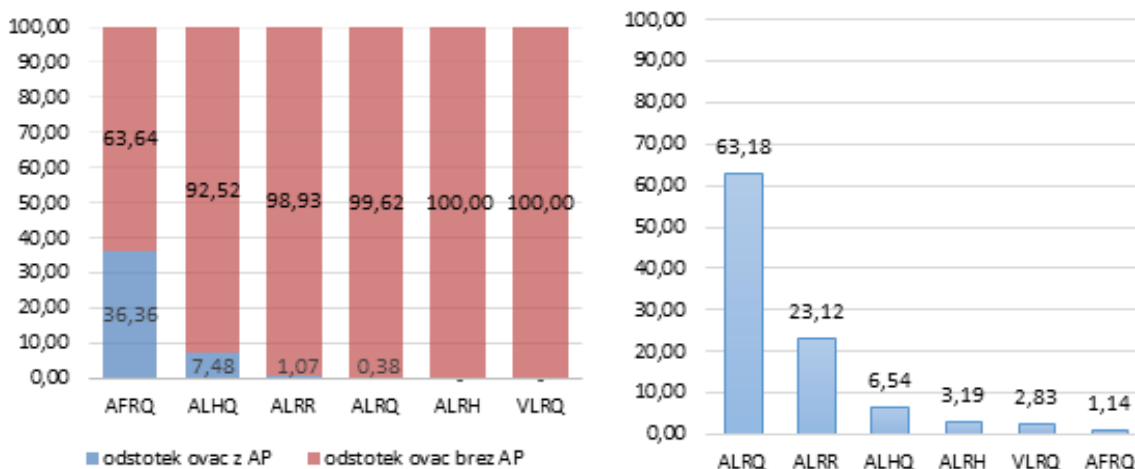
Rezultati

Prevalenca atipičnega praskavca v Sloveniji je 0,001. Rezultati monitoringa kažejo, da se v populaciji ovac v Sloveniji najpogosteje pojavlja alel ALRQ. Najnižja je frekvenca alela AFRQ, ki je bil ugotovljen v 1,14 % od vseh preiskovanih ovac skozi vsa leta. Odstotki posameznih alelov se skozi leta ohranjajo. Slika 1 prikazuje odstotke posameznih alelov *Prnp*. Prikazan je tudi odstotek ovac z atipičnim praskavcem znotraj posameznega alela. Razvidno je, da za atipičnim praskavcem najpogosteje obolevajo živali z alelom AFRQ in/ali ALHQ.

Vse ovce z atipičnim praskavcem, razen ene, za katero nimamo podatka o pasmi, so bile jezersko-solčavske pasme ali križane s to pasmo. Vse obolele ovce so bile starejše od 4 let (do 10 let).

Razprava

Genotipi ovac, ki vsebujejo alel AFRQ so visoko dovzetni na atipični praskavec (1, 2, 3, 4), kar se, kljub nizki frekvenci alela AFRQ v naši populaciji ovac, kaže tudi v naši študiji. Čeprav je v populaciji ovac prisotnih le 1,14 % alela AFRQ, imajo tri ovce z atipičnim



Slika 1: Odstotek ovac z atipičnim praskavcem in odstotek ovac brez praskavca znotraj posameznega alela *Prnp*, določenega pri monitoringu genotipov naključno izbranih poginulih ovac (levo). Odstotek posameznih alelov *Prnp*, ugotovljen pri monitoringu genotipov (desno) (n = 1680) (AP – atipični praskavec)

praskavcem od desetih vsaj en alel AFRQ (1 x AFRQ/AFRQ in 2 x v heterozigotni obliki). Pri sedmih ovcah z atipičnim praskavcem smo določili alel ALHQ vsaj v eni kopiji (1 x ALHQ/ALHQ in 6 x v heterozigotni obliki). Alel ALHQ se glede na podatke, pridobljene pri monitoringu alelov pri poginulih ovcah v Sloveniji, pojavlja pri 6,5 % ovac, zato lahko pričakujemo, da se bo atipični praskavec še pojavljal v naši populaciji ovc.

Na dovzetnost na praskavec vpliva tudi pasma ovac (4), iz pregleda pasem, kjer se pojavlja atipični praskavec, lahko sklepamo, da je jezersko-solčavska pasma dovzetna za to obliko prionske bolezni.

Zahvala

Avtorji se zahvaljujemo Magdaleni Dobravec za odlično tehnično pomoč pri izvedbi določanja genotipov. Določanje genotipizacije *Prnp* pri ovcah je bilo izvedeno pod okriljem Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin.

Reference

1. Prusiner SB. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 13363-83.
2. Benestad SL, Sarradin P, THU b, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and the designation of a new type, Nor98. Vet Rec 2003; 153: 202-8.
3. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014. Scientific Opinion on the scrapie situation in the EU after 10 years of monitoring and control in sheep and goats. EFSA Journal 2014;12:3781, 155.
4. Benestad SL, Arzac JN, Goldmann W, Nöremark M. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. Vet Res 2008; 39:19.
5. Zabavnik Piano J, Cotman M, Pogačnik M, Juntos P. Scrapie-susceptibility-linked polymorphisms of the prion protein gene in Istrian Pramenka sheep. Slov vet res 2004; 41: 83-8.

Genotypes of prion protein gene in sheep with atypical scrapie in Slovenia

Atypical scrapie is a form of transmissible spongiform encephalopathy (TSE). It is observed in most European countries and represents a growing proportion of detected scrapie cases in sheep. Ovine atypical scrapie was established in Slovenia for the first time in 2010 after introduction of the test that was sensitive enough to detect the form of prions characteristic for atypical scrapie. From the beginning of 2010 to the end of March 2016 we tested for scrapie 8633 sheep and confirmed 10 cases of atypical scrapie. Susceptibility to classical and atypical form of scrapie is at least partly genetically determined. It is known that sheep with the prion protein gene (*Prnp*) genotype ARR/ARR are the most resistant to the development of classical form of scrapie, the sheep with the genotype VRQ/VRQ are the most susceptible. Conversely, atypical scrapie often occurs in sheep with ARR allele and rarely in sheep carrying the VRQ allele. In addition, development of the disease is significantly affected by the amino acid at position 141 of the prion protein (phenylalanine or leucine). Comparison of *Prnp* genotypes of sheep with atypical scrapie to genotypes of 1,680 randomly selected dead sheep showed that atypical scrapie does not occur in sheep carrying alleles VLRQ and ALRH. It was detected in sheep with allele AFRQ, although in Slovenia proportion of ewes with this allele is small (1.14% of the sample of sheep) and in animals with allele ALHQ. Only a small proportion of diseased sheep had allele ALRR and ALRQ. Allele ALHQ in Slovenia occurs in 6.5% of sheep, so we can expect that the atypical scrapie would occur in our sheep population.

Key words: transmissible spongiform encephalopathies; atypical scrapie; genotype; prion protein gene