

Resistencia genética a las encefalopatías espongiformes transmisibles

Los factores genéticos que influyen en la susceptibilidad y el desarrollo de una EET animal están todavía en estudio. Es un tema novedoso, sobre todo en lo que se refiere a la EEB, ya que el descubrimiento de un gen directamente implicado en el desarrollo de esta enfermedad permitiría la aplicación de un sistema de control mediante la selección de animales resistentes.

A continuación se presentan algunos de los conocimientos actuales respecto a este tema, comenzando por una introducción histórica de las investigaciones realizadas, seguida de una descripción de los polimorfismos del gen de la proteína prión que han sido relacionados con modificaciones en el período de incubación de las EET o con la susceptibilidad a las mismas en distintas especies. De forma más exhaustiva se describen los factores genéticos implicados en el scrapie ovino y su aplicación en planes de selección dirigidos a la obtención de animales resistentes.

INTRODUCCIÓN

Los experimentos destinados a conocer la interacción compleja entre los genes del hospedador y la infección con un tipo específico de cepa de scrapie en ovino comenzaron en los años 50 con las investigaciones desarrolladas por Gordon, en las que se inocularon 24 razas distintas con el mismo extracto. El resultado, publicado en 1966, mostraba que había un amplio rango de variación en cuanto a la susceptibilidad en las distintas razas. La incidencia de la enfermedad variaba entre un 78% en la raza Herdwick y nula en el ovino Dorset Down. Además, el período de incubación en aquellas ovejas que desarrollaban la enfermedad también variaba entre razas, con valores que oscilaban entre 100 y 690 días. Esta diferencia en la susceptibilidad también se observó en distintas líneas de ratón; aunque en este caso las 4 líneas inoculadas desarrollaron la enfermedad, el período de incubación variaba entre 140 y 280 días tras la inoculación.

Otra evidencia de la existencia de factores genéticos del hospedador con influencia en la susceptibilidad a esta enfermedad surgió a partir de los estudios realizados con scrapie, tanto por infección natural como experimental, en Edimburgo (NPU, Neuropathogenesis Unit) en 1961 con las razas Cheviot y Herdwick. Estas experiencias han contribuido de forma importante al conocimiento de los mecanismos genéticos subyacentes a estas enfermedades. Los animales eran sometidos a una inyección subcutánea con un extracto infeccioso (SSBP/1 Sheep Scrapie Brain Pool 1) y posteriormente seleccionados siguiendo como criterio la duración del período de incubación, obteniéndose dentro de la misma raza una línea sensible y una resistente. En la línea resistente a scrapie los animales no presentaban signos clínicos después de la infección subcutánea. Sin embargo, tras inoculación por vía intracerebral (IC) la enfermedad acababa desarrollándose, pero después de un período de incubación más de cuatro veces superior al de la línea sensible. Estos resultados se repitieron con extractos de distinto origen con la excepción del homogeneizado con CH1641, donde se produjo una inversión de la resistencia entre las dos líneas de Cheviot. La existencia de una interacción entre la cepa de scrapie y la genética del hospedador fue confirmado por Goldman *et al.*

Dickinson *et al* habían propuesto que el efecto observado estaba mediado por un gen que denominaron *Sip* (*Scrapie incubation period*) que presentaba dos alelos sA (*short incubation*) y pA (*prolongated incubation*), teniendo el primero un efecto dominante sobre el segundo. Posteriormente, estudios de genética molecular realizados por Hunter *et al* demostraron que el gen *Sip* y el gen que codifica para la proteína prión eran probablemente el mismo gen. En el artículo de Elsen *et al* se puede encontrar una revisión sobre la genética de la susceptibilidad al scrapie en la especie ovina.

EL GEN DE LA PROTEÍNA PRIÓN (*PRNP*)

El gen *PRNP* tiene una longitud variable (dependiendo de la especie) entre 16.000 y 22.000 bases. Está formado por dos o tres exones, según la especie, si bien toda la región codificante (ORF) se encuentra en un único exón. Este gen codifica una glicoproteína de membrana (la proteína prión) que posee entre 230 y 255 aminoácidos y cuya secuencia está altamente conservada entre especies. La Fig 1 muestra un esquema de la estructura del gen *PRNP*, así como de la proteína que codifica.

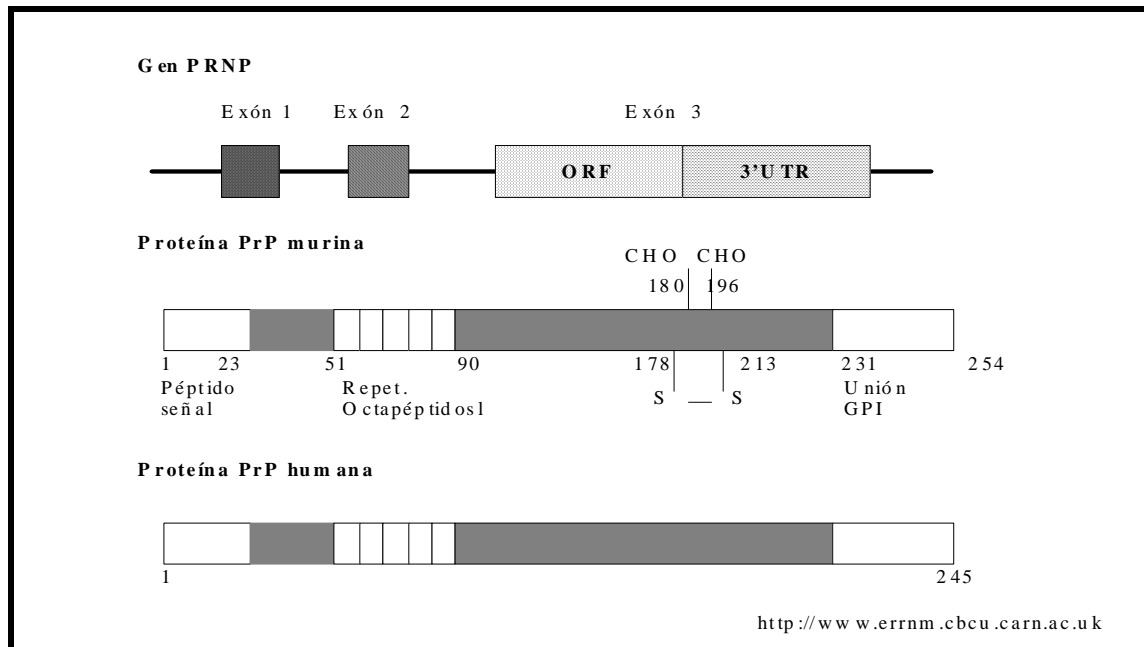


Fig 1.- Esquema de la estructura del gen *PRNP*

El gen *PRNP* se ha identificado en un gran número de especies, tanto domésticas como salvajes. La homología entre las distintas especies es muy elevada, por ejemplo un 94% de la secuencia nucleotídica de las especies bovina y ovina es idéntica. A su vez, estas especies muestran una homología con el gen humano del 66.7% y del 65.4%, respectivamente.

POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN *PRNP*

Se han descrito un gran número de polimorfismos o variantes genéticas en el gen *PRNP* en distintas especies. Alguno de ellos se muestra en la Fig 2.

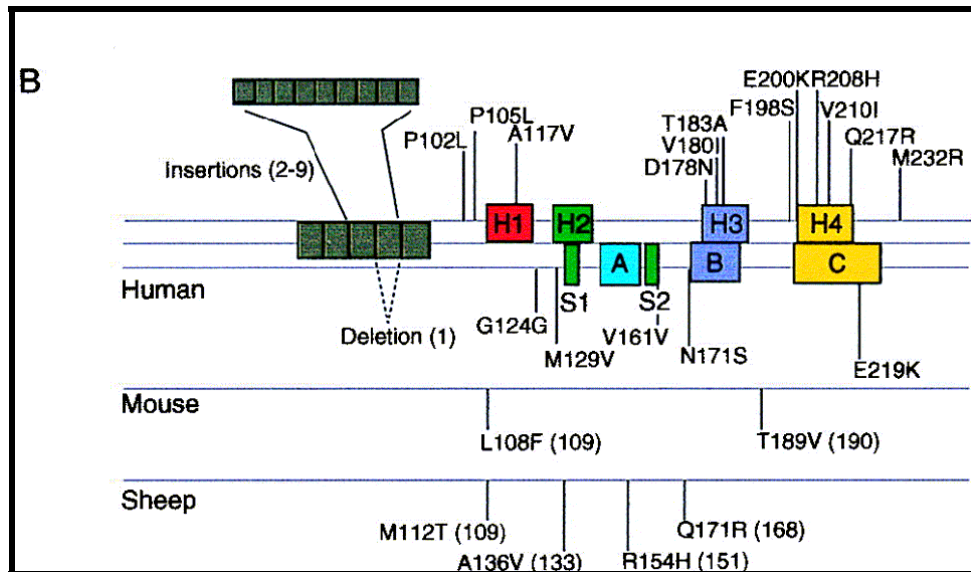


Fig 2.- Polimorfismos del gen *PRNP*

En general, estos polimorfismos se pueden clasificar en:

- Mutaciones puntuales: un cambio de un nucleótido en un codón da lugar a un cambio aminoacídico en la proteína.
- Inserciones y deleciones: se producen en la región de octapéptidos dando lugar a un número distinto de repeticiones (según los individuos).

El desarrollo de una EET de forma natural está fuertemente influenciado por las alteraciones en el gen del hospedador que codifica para la proteína PrP. Estos polimorfismos pueden influir en la conversión de PrP^c en la isoforma patógena PrP^{sc}. Los mecanismos por los que una variante alélica individual conduce a una susceptibilidad alterada o a un cambio en el período de incubación no han sido bien definidos. Se ha propuesto que, en humanos, los polimorfismos de PrP pueden presentarse en sitios críticos implicados en la transición de conformación de PrP^c a PrP^{sc}.

Polimorfismos de PRNP en humano: Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

El gen de la proteína PrP humana se localiza en el cromosoma 20, tiene una longitud de 16.000 bases y codifica una proteína de 253 aminoácidos. Ciertas mutaciones dan lugar a un cambio aminoacídico que al provocar un cambio conformacional del plegamiento de la proteína prión, origina una EET. Se han observado mutaciones en las formas familiares de la enfermedad de CJD, en el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y en el Insomnio Fatal Familiar (FFI). Por ejemplo, la mutación que supone el cambio de Prolina por Leucina en el codón 102 es suficiente para causar una forma de GSS. Los distintos polimorfismos observados en la especie humana se deben a inserciones o deleciones de octapéptidos o a mutaciones puntuales. En la actualidad se han descrito 25 mutaciones en el gen *PRNP* humano, no todas ellas ligadas al desarrollo de la enfermedad. La causa más frecuente de CJD familiar es la mutación puntual en el codón 200, esta mutación aparece en más del 70% de familias con CJD hereditaria en todo el mundo. Una larga lista de mutaciones detectadas en la especie humana, así como su relación con determinadas patologías están actualmente descritas (http://www.bseinquiry.gov.uk/report/volume2/tab2_2.htm).

La predisposición genética tiene su influencia en todos los tipos de EETs (familiar, iatrogénica y esporádica). El codón 129 parece ser el que está implicado en esta predisposición. Así, los casos iatrogénicos resultantes del uso de la hormona de crecimiento están asociados con el genotipo homocigoto Valina en este codón. Por otro lado, los casos de la v-CJD han aparecido en individuos homocigotos Metionina.

La genética del scrapie en ratón

Los citados estudios de Dickinson *et al* basados en la inoculación experimental de distintas líneas de ratón, trataban de estudiar el papel de los genes de este hospedador en el control de los períodos de incubación de scrapie. Los primeros resultados indicaban que la duración del período de incubación estaba controlada por un gen que se denominó *Sinc* (*Scrapie Incubation*). Posteriormente, se han identificado polimorfismos en los codones 108 y 189 del gen murino de *PRNP* que determinan diferencias en el período de incubación de la enfermedad.

Esta especie animal se ha utilizado como modelo para confirmar la importancia de las mutaciones detectadas en el gen *PRNP* humano. Mediante la producción de ratones transgénicos que portan las distintas variantes del gen humano, se determina la susceptibilidad del animal a la inoculación experimental.

Finalmente, se han desarrollado estudios dirigidos a identificar los denominados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que influyen en el período de incubación, al tratarse de un carácter cuantitativo en el que puede estar implicado un gran número de genes. Los resultados de algunos trabajos indican la posible existencia de QTLs en los cromosomas 2, 11 y 12 de ratón, mientras que los de otros localizan sendos QTLs en los cromosomas 9 y 11 de la misma especie.

Polimorfismos del gen *PRNP* en animales carnívoros

EET del visón

La EET del visón es una enfermedad rara que se detectó por primera vez en Estados Unidos en 1947. El primer documento científico sobre esta enfermedad data de 1965 y desde entonces se han descrito varios focos. Esta patología se presenta únicamente en visones criados de forma comercial y tiene un curso clínico particularmente corto. Los estudios epidemiológicos sugieren que los animales contraen la enfermedad por exposición externa al agente infeccioso, como puede ser el consumo de piensos contaminados.

Existen muy pocas referencias bibliográficas en el que se estudie la genética de esta enfermedad; únicamente se observa el fenómeno de *barrera de especie* entre visón americano y turón (hurón salvaje). Estas dos especies muestran bastantes diferencias respecto a la susceptibilidad al agente de la EET del visón, siendo el período de incubación mucho más largo en el turón. La proteína príon en ambas especies no muestra diferencias cuando se analiza por Western Blot y la expresión del gen también es similar. Según los análisis del gen *PRNP* del visón y del turón, se han llegado a observar 6 mutaciones silentes (sin cambio aminoacídico), un cambio de Fenilalanina por Lisina en el codón 179 y otro de Arginina por Glutamina en el codón 224, sugiriendo que la barrera entre estas dos especies podría tener su origen en esta región polimórfica del gen *PRNP*.

EET felina

Esta enfermedad se diagnosticó por primera vez en 1990 en un macho siamés, desde entonces se han detectado múltiples casos en el Reino Unido. Se considera la posibilidad de que se trate de una enfermedad nueva que tenga su origen en la epidemia de EEB, transmitiéndose a los gatos por el consumo de carne contaminada. Según nuestro conocimiento, no parece haberse encontrado la zona polimórfica en el gen *PRNP* felino. Por otro lado, el gen *PRNP* del perro posee muchas similitudes estructurales con el gato, incluso se afirma que si nos basamos únicamente en la estructura del gen, el perro tendría la misma susceptibilidad que el gato a padecer la enfermedad.

Polimorfismo de *PRNP* en rumiantes

Enfermedad crónica caquetizante del ciervo

Con respecto a los factores genéticos que controlan la susceptibilidad o resistencia a esta enfermedad, se ha identificado un polimorfismo en el codón 132 del gen *PRNP* que consiste en el cambio de Metionina por Leucina. Se han detectado casos positivos en los homocigotos Metionina y en los heterocigotos 132 Metionina/Leucina. El hecho de que no se hayan diagnosticado casos positivos en los animales homocigotos para Leucina, tal vez facilite la posibilidad de realizar un control de la enfermedad mediante técnicas de genotipado.

En el ciervo de cola blanca se ha determinado la existencia de polimorfismos en el codón 96 (Glicina/Serina), en el codón 138 (Serina/Asparagina) y en el 226 (Glutamina/Glutámico) y se cree que Glicina 96 y Serina 138 puedan predisponer al padecimiento de la enfermedad.

Recientemente se ha descrito un nuevo polimorfismo en el codón 95 (Glutamina/Histidina) en el ciervo de cola blanca, de forma que se han comparado animales positivos y negativos y se ha demostrado que la mayoría de los animales positivos presentaban el haplotipo Glutamina/Glicina/Serina (95/96/138).

EEB

El gen que codifica para la proteína príon bovina tiene un tamaño de 20-22.000 bases, se encuentra en el cromosoma 13 (13q17) y presenta una homología con el humano del 66.7% y con el ovino del 94%. La secuencia aminoacídica de la proteína codificada difiere de la ovina en 7 u 8 posiciones.

Como consecuencia de la epidemia de EEB sufrida en el Reino Unido, se han desarrollado muchos trabajos con el fin de detectar la base genética de esta enfermedad en la especie bovina. Además de la necesidad de contacto con el agente (relacionada con el consumo de piensos contaminados), la epidemiología de esta enfermedad induce a pensar que, al igual que ocurre en otras especies como humano u ovino, existe un componente genético.

En esta especie se han detectado 2 mutaciones silentes en el exón 3 y polimorfismo en el número de repeticiones de octapéptidos (5 y/o 6 copias). Aunque el polimorfismo en la región de octapéptidos se ha asociado con la enfermedad en otras especies, no se han encontrado diferencias ni en el cambio del número de repeticiones ni en las mutaciones silentes entre los animales afectados por EEB y sus parientes.

Recientemente, se ha demostrado la asociación entre la susceptibilidad a EEB y la inserción / delección de 23 pares de bases en la región promotora del gen *PRNP*.

Scrapie caprino

La aparición de scrapie en cabras de forma natural se ha descrito en un gran número de países: Francia, Reino Unido, Suiza, Estados Unidos, Canadá, Chipre, Italia, Grecia y España.

El gen *PRNP* caprino codifica para una proteína de 255 aminoácidos. Además de 4 mutaciones silentes en los codones 42, 107, 138 y 207 se han detectado mutaciones en otros 17 codones. En la Tabla 1 se muestran los polimorfismos descritos en el gen *PRNP* caprino. Únicamente las mutaciones descritas para los codones 102, 142, 143 y 154 parecen estar relacionadas con el período de incubación o la susceptibilidad a la enfermedad, siendo las variantes G₁₀₂, M₁₄₂, R₁₄₃ y H₁₅₄ las que podrían conferir cierta resistencia al individuo.

Además de las mutaciones que suponen un cambio aminoacídico, en la cabra también se ha descrito un polimorfismo en la región de octapéptidos: se produce una delección, pasando de 5 a 3 repeticiones. El alelo más corto (3 repeticiones) parece estar relacionado con un cambio en el período de incubación de la enfermedad.

Tabla 1.- Mutaciones con cambio aminoacídico descritas en el gen *PRNP* caprino.

Codón	Mutación	Codón	Mutación
21	V → A	143	H → R
23	L → P	146	N → S / D
37	G → V	151	R → H
49	G → S	154	R → H
102	W → G	168	P → O
110	T → P	211	R → G
127	G → S	218	I → L
133	L → O	220	O → H
137	M → I	222	O → L
142	I → M	240	P → S

Scrapie ovino

Las primeras investigaciones destinadas a la identificación de una base genética que pudiera explicar la diferencia en cuanto a la susceptibilidad y al desarrollo de una EET se llevaron a cabo en la especie ovina. De hecho, la influencia de la genética del hospedador en esta especie es una de las mejor conocidas, incluso se han llegado a establecer relaciones entre ciertos polimorfismos del gen *PRNP* y la susceptibilidad al scrapie. En la actualidad se están aplicando estos conocimientos en el control de esta enfermedad.

El gen *PRNP* ovino tiene un tamaño de 20.000 pb y codifica para una proteína de 256 aminoácidos. Este gen ha sido localizado en el cromosoma 13. El gen presenta un alto grado de polimorfismo, habiéndose descrito 32 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico en 22 codones distintos (la Tabla 2 muestra estos polimorfismos). La mayoría son raros y no se han asociado con ningún fenotipo de la enfermedad, ni en la infección natural ni en la experimental. Sin embargo, las variantes genéticas de los codones 136, 154 y 171 parecen tener influencia en la susceptibilidad a la enfermedad. Del conjunto total de posibles alelos (2x2x3), sólo 5 se detectan (véase Tabla 3) con una frecuencia relativamente alta.

Tabla 2.- Mutaciones con cambio aminoacídico descritas en el gen *PRNP* ovino.

Codón	Mutación	Codón	Mutación
101	Q → R	167	R → S
112	M → T	171	Q → R, H, K
127	G → A, V, S	172	Y → D
136	A → T, A, V	175	Q → E
137	M → T	176	N → K
138	S → N	180	H → Y, T
141	L → F	189	Q → R, L
143	H → R	195	T → S
151	R → C, G, H	196	T → S
152	Y → F	211	R → Q
154	R → H	241	P → S

Tabla 3.- Alelos de *PrP* relacionados con la susceptibilidad a scrapie (extraída de: Dawson *et al.*, 1998).

Codones	136	154	171
Forma ancestral	Ala (A)	Arg (R)	Gln (Q)
Formas mutadas:	Val (V)	Arg (R)	Gln (Q)
	Ala (A)	His (H)	Gln (Q)
	Ala (A)	Arg (R)	Arg (R)
	Ala (A)	Arg (R)	His (H)

La forma original del gen parece ser la variante ARQ, habiéndose originado el resto de alelos mediante mutaciones puntuales. La frecuencia y distribución de las distintas combinaciones varía según la raza (Tabla 4).

Tabla 4.- Distribución de los alelos de *PrP* en distintas razas ovinas europeas (extraída de: Dawson *et al.*, 1998).

Alelos Predominantes	Razas
ARQ, ARR	Cotswold, Hampshire Down, Suffolk, Vendeen
ARQ, ARR, VRQ	Bleu du Maine, Border Leicester, Charollais, Poll Dorset, Wensleydale
ARQ, ARR, AHQ	Bluefaced Leicester
ARQ, ARR, AHQ, VRQ	Cheviot, Dalesbred, Herdwick, Scottish Blackface, Shetland, Swaledale, Welsh Mountain
ARQ, ARR, AHQ, VRQ, ARH	Texel, Lleyn

En los últimos años se han publicado numerosos trabajos en los que se determina la distribución de estos alelos en otras razas europeas. Concretamente, parece ser que los alelos predominantes en las poblaciones ovinas españolas son ARQ, ARR, ARH. Resultados similares se han obtenido en la raza Sarda italiana y en razas portuguesas. (Revisión de factores genéticos en rumiantes ver artículo el adjunto, Goldmann *et al.*, 2008)

GENOTIPO DEL GEN *PRNP* Y EL SCRAPIE CLÁSICO OVINO

Según los datos obtenidos principalmente de razas británicas y francesas, existe una clara influencia del genotipo de *PRNP* para los codones 136, 154 y 171 sobre la susceptibilidad del animal a scrapie clásico. El genotipo de *PRNP* se muestra como el principal factor asociado a la incidencia de esta enfermedad, mientras que la transmisión horizontal y vertical parecen tener menor importancia. Las conclusiones que se obtuvieron a partir de estas investigaciones se resumen a continuación:

- El alelo VRQ es el más estrechamente relacionado con la susceptibilidad a scrapie. Los animales homocigotos para este alelo son los animales de mayor riesgo. Los heterocigotos con el alelo resistente (ARR y AHQ) tienen menor riesgo.
- La forma original ARQ también se ha asociado con la susceptibilidad a esta enfermedad, aunque con un menor riesgo o una penetrancia menor que el VRQ.
- Los alelos ARR y AHQ se han asociado con resistencia a esta EET.

El grupo nacional de información de scrapie establecido en el Reino Unido desarrolló una guía “universal” para clasificar los 15 posibles genotipos del PrP en niveles de riesgo. Con este objetivo se establecieron distintas clasificaciones de genotipos teniendo en cuenta los alelos predominantes en las distintas razas. Los genotipos se agrupan en función del nivel de riesgo del animal y del de su posible progenie. Dawson *et al* proporcionan estas tablas de riesgos enfatizando que las interpretaciones de esta clasificación están basadas en probabilidades y no en certezas. Las tablas se revisan de forma periódica y pueden estar sujetas a modificaciones.

Las distintas agrupaciones de los genotipos se basan en el riesgo al desarrollo de la enfermedad (R) y han sido valoradas de R1 a R5.

- R1: indica un riesgo muy bajo de desarrollar la enfermedad en el individuo y un riesgo muy bajo en la progenie de primera generación;
- R2: indica un riesgo bajo del individuo y de la progenie.
- R3: indica un riesgo bajo individual, pero el de la progenie puede aumentar dependiendo del genotipo del otro parental.
- R4: indica que el scrapie se puede encontrar de forma ocasional y que la progenie tiene mayor riesgo que la del grupo anterior.
- R5: indica que este ovino tiene el mayor riesgo de desarrollar scrapie.

La Guía en el uso del genotipado de *PrP* como una ayuda al control del scrapie clínico realiza distintas clasificaciones en función de los alelos predominantes de las razas, no obstante se ha unificado una única clasificación universal para todas las razas (Tabla 5).

Genotipo	Categoría de riesgo
ARR/ARR	Riesgo 1
ARR /ARQ ARR/ARH ARR/AHQ	Riesgo 2
ARQ/ARH ARQ/AHQ AHQ/AHQ ARH/ARH AHQ/ARH ARQ/ARQ	Riesgo 3
ARR/VRQ	Riesgo 4
AHQ/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Riesgo 5

Tabla 5.- Clasificación de riesgos para razas con los cinco alelos.

GENOTIPO DEL GEN *PRNP* Y EL SCRAPIE ATÍPICO OVINO

Recientemente se han descrito casos de la enfermedad de scrapie, cuyas características clínicas, patológicas, inmunoquímicas y estructurales, difieren en gran medida de la enfermedad clásica de scrapie. En la actualidad, se considera que estos casos se han producido como consecuencia de la aparición de cepas atípicas de scrapie, diferentes de las descritas hasta ahora y denominadas genéricamente cepas clásicas.

La primera descripción de la presencia de cepas atípicas de scrapie en Europa fue en Noruega, cuyo descubrimiento en el año 1998 da origen al propio nombre de una de estas cepas, la Nor98. Posteriormente, se han ido describiendo nuevos casos a lo largo de toda Europa.

Una de las características más importantes del scrapie atípico es que parece estar asociado a animales con genotipo resistente al scrapie clásico, incluidos los animales ARR homocigotos. Además pocas infecciones por scrapie atípico están asociadas al haplotipo sensible (VRQ). Del mismo modo, se ha visto relación entre el polimorfismo 141 leucina (L) / fenilalanina (F) (Fig.2) y la susceptibilidad a las cepas atípicas.

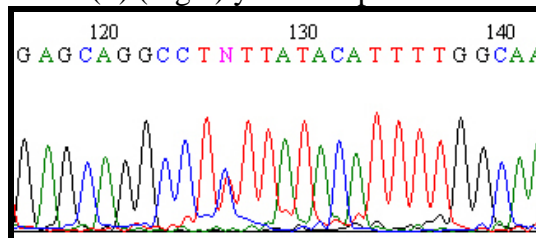


Fig 3. Polimorfismo del codón 141 (L/F)

GENOTIPO DEL GEN *PRNP* Y LA EEB EN EL OVINO

Respecto a la susceptibilidad a la EEB, se han realizado infecciones experimentales en ovino, y se ha demostrado que el genotipo ARQ/ARQ es el más sensible a dicha infección. Una publicación reciente muestra los resultados de un experimento llevado a cabo en Compton (Reino Unido), tras inoculación IC con EEB, 17 de 19 ovejas ARQ/ARQ desarrollaron la enfermedad tras un período de incubación medio de 18 meses y medio mientras que, hasta el momento, una única oveja ARR/ARR sobre un total de 19 desarrolló la enfermedad tras un período de incubación de 33 meses y medio.

El comportamiento de la EEB en la oveja es similar al scrapie, de forma que si realmente se hubiera producido la transmisión de la EEB a la oveja nos enfrentaríamos a los mismos problemas que los hallados en la erradicación del scrapie. En los últimos años se están llevando a cabo numerosos trabajos de investigación con el fin de determinar si la EEB se ha podido transmitir al ganado ovino.

Otro hecho importante, y que no debemos olvidar, es que, aparentemente, sólo los fetos con genotipos ARQ/VRQ, VRQ/VRQ y posiblemente ARQ/ARQ acumulan PrPsc en la placenta, luego estos fetos son los principales causantes de la transmisión de la enfermedad, ya que si no se produjera esa transmisión, el control de esta EET sería mucho más sencillo.

Respecto al papel protector o no que otros codones polimórficos (diferentes de 136, 154 y 171) del gen *PRNP* pueden ejercer frente a la enfermedad de scrapie o EEB, recientemente se ha demostrado el posible efecto protector de la variante ARL168Q

frente a la EEB experimental y de las variantes M137T, I142K y N176K tanto frente a scrapie como a EEB experimental.

EL PROGRAMA DE GENOTIPADO COMO HERRAMIENTA DE ERRADICACIÓN DE LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN ESPAÑA

Como consecuencia de la imposibilidad de tener un método fiable para el diagnóstico *in vivo* de las EETs, su control se debe realizar mediante la ejecución de una vigilancia activa y pasiva. Además, como complemento, el genotipado debe utilizarse como una herramienta para pronosticar el riesgo de padecer la enfermedad.

Cuando se detecta un caso positivo, una vez que se realiza el análisis de los animales restantes del rebaño, muy pocos animales son diagnosticados como positivos, de forma que el sacrificio masivo de toda la explotación podría ser una medida desmesurada. Sería preferible analizar el genotipo de los animales del rebaño y sacrificar únicamente aquellos que posean una clínica compatible con EET, y aquellos con genotipo sensible.

Los programas de vigilancia basados en el genotipado de los animales se están aplicando en diversos países y, aunque todavía es un poco precipitado sacar conclusiones, parecen estar dando resultados positivos. Además de los programas de vigilancia activa y pasiva, distintas Decisiones de la Comisión Europea se dirigen hacia el establecimiento de programas de mejora enfocados a la selección de una resistencia del ganado ovino a las EETs junto con la definición de medidas a tomar en caso de ser detectado un foco de scrapie, ambas medidas basadas principalmente en el genotipo para el gen *PRNP*.

La Decisión de la Comisión del 18 de diciembre de 2002 (2002/1003/EC) propone que cada país determine la frecuencia de animales resistentes ARR/ARR en cada una de sus razas autóctonas.

Posteriormente, el 12 de febrero de 2003 se hace pública la Enmienda (EC) No 260/2003 al Reglamento (EC) No 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo enfocada a la erradicación de EETs en ovino y caprino y estableciendo las reglas para el comercio de ganado vivo de estas mismas especies, así como de embriones bovinos. En esta enmienda se establece también que en caso de ser detectado un caso de scrapie en un rebaño se deben sacrificar, o todos los animales de la explotación o el siguiente grupo de animales:

- todos los animales en los que se detecte la enfermedad,
- todos los rumiantes distintos de ovino y caprino presentes,
- si se pueden identificar, se sacrificarán los padres y la progenie del animal en el que la enfermedad se haya confirmado. También se destruirán todos los embriones y los óvulos de estos animales.
- con el fin de no sacrificar todo el resto del rebaño, esta enmienda establece que se pueden mantener los machos reproductores de genotipo ARR/ARR, las hembras reproductoras que porten al menos un alelo ARR y ningún VRQ, y el ovino que porte al menos un alelo ARR y sea destinado a consumo.

En esta misma enmienda se establece que, en aquellas explotaciones en las que se ha diagnosticado scrapie y se han tomado las medidas de sacrificio descritas anteriormente, sólo se podrán introducir los siguientes animales:

- machos resistentes (ARR/ARR),
- hembras reproductoras que porten al menos un alelo ARR y ningún VRQ,
- cabras si se prueba que :
 - sólo hay ovinos homocigotos ARR/ARR en la explotación,
 - se han llevado a cabo las premisas de desinfección y limpieza,
 - la explotación será sometida a monitorización de EETs.

Se propone una transitoria hasta el 1 de enero de 2006 por la que los Estados Miembros pueden permitir la entrada de corderas no gestantes de genotipo desconocido si no se pueden obtener animales de genotipo conocido.

Se establecen también qué líneas germinales se pueden mantener en explotaciones donde ha aparecido un foco:

- Semen de machos ARR/ARR
- Embriones que porten al menos un alelo ARR y ningún VRQ.

Si se han aplicado las medidas anteriores, los machos ARR/ARR procedentes de esta explotación no estarán sujetos a ninguna restricción de movimiento. Las hembras heterocigotas para ARR sólo podrán enviarse a matadero y los animales con otros genotipos deberán ser destruidos.

Cuando la frecuencia del alelo ARR dentro de la raza o de la explotación sea muy baja, el Estado Miembro puede decidir mantener animales con otros genotipos a los referidos anteriormente siempre que ninguno de ellos porte el alelo VRQ.

En cuanto al comercio de animales vivos dentro de la comunidad, la enmienda establece que estos animales deben ser homocigotos ARR/ARR o provenir de explotaciones que cumplan los siguientes requisitos:

- estén sujetas a exámenes veterinarios oficiales,
- los animales estén marcados,
- no se haya confirmado ningún caso de scrapie,
- los animales de desvieje hayan sido seleccionados para el examen diagnóstico de EETs,
- las hembras introducidas en esas explotaciones provengan de explotaciones similares a éstas.

Por otra parte, la Decisión de la Comisión del 13 de febrero de 2003 (2003/100/EC) establece los requerimientos mínimos para los programas de mejora destinados a la resistencia frente a las EETs en oveja. Esta decisión ha sido derogada por el Reglamento 727/2007 de la Comisión de 26 de junio de 2007 en el que se describen las características más relevantes respecto a la selección genética de los rebaños de cría:

Requisitos generales

1. Se concentrará en rebaños de alto valor genético.
2. Creación de una base de datos que contendrá:

- a) identidad, raza y número de cabezas de todos los rebaños que participan en el programa de cría;
 - b) identificación de cada animal muestreado en el programa de cría;
 - c) resultados de cualquier prueba de genotipado realizada.
3. Se establecerá un sistema de certificación uniforme en el que el genotipo de cada animal muestreado en el programa de cría se certificará mediante referencia a su número de identificación individual.
 4. Se pondrá en funcionamiento un sistema para la identificación de animales y de muestras.
 5. El genotipado de sangre u otros tejidos recogidos con objeto del programa de cría se realizará en laboratorios autorizados para el programa.
 6. La autoridad competente del Estado miembro podrá ayudar a empresas de cría a crear bancos genéticos consistentes en esperma, óvulos o embriones representativos de genotipos de proteínas priónicas que puedan hacerse raros de resultados del programa de cría.
 7. Se establecerán programas de cría para cada raza, teniendo en cuenta:
 - a) las frecuencias de los distintos alelos en la raza;
 - b) la rareza de la raza;
 - c) que se eviten la endogamia y la deriva genética.

Requisitos específicos

1. El programa de cría tendrá como objetivo aumentar la frecuencia del alelo ARR en el rebaño ovino, y reducir la prevalencia de los alelos conocidos por contribuir a la sensibilidad a las EET.
2. Los requisitos mínimos para los rebaños participantes serán los siguientes:
 - a) cada uno de los animales del rebaño cuyo genotipo se vaya a determinar se identificará de manera segura;
 - b) todos los machos del rebaño destinados a la reproducción se someterán al genotipado antes de servir para la reproducción;
 - c) cualquier macho portador del alelo VRQ será sacrificado o castrado antes de transcurridos seis meses desde la determinación de su genotipo; este animal no saldrá de la explotación si no es para el sacrificio;
 - d) las hembras portadoras del alelo VRQ no saldrán de la explotación si no es para el sacrificio;
 - e) los machos, incluidos los donantes de esperma para inseminación artificial, distintos de los certificados para el programa de cría, no se usarán para reproducción en el rebaño.
3. Los Estados miembros podrán conceder excepciones a efectos de protección de razas y de características de producción.

Marco para el reconocimiento de la calificación como resistentes a las EET de algunos rebaños ovinos

1. El marco reconocerá la calificación como resistentes a las EET de los rebaños ovinos que, de resultados de su participación en el programa de cría, cumplan los criterios exigidos por el programa.

Este reconocimiento se concederá, como mínimo, en los dos niveles siguientes:

- a) los rebaños de nivel I estarán totalmente compuestos por ovinos de genotipo ARR/ARR;
- b) los rebaños de nivel II será aquellos cuya progenie haya sido engendrada exclusivamente por machos de genotipo ARR/ARR.

Los Estados miembros podrán reconocer otros niveles, en función de sus requisitos nacionales.

2. Se realizarán muestreos regulares aleatorios de los ovinos de rebaños resistentes a las EET:

- a) en la explotación o en el matadero, para verificar su genotipo;
- b) en el caso de rebaños de nivel I, de los ovinos mayores de 18 meses en el matadero, para someterlos a pruebas de las EET.

Este reglamento se mantuvo en suspensión dadas determinadas actuaciones a realizar respecto a la erradicación del scrapie, pero fue nuevamente aceptado en el Reglamento (CE) No 1428/2007 de la Comisión de 4 de diciembre de 2007.

CONSIDERACIONES EN LA APLICACIÓN DEL GENOTIPADO DE *PRNP* EN LOS PLANES DE SELECCIÓN

El estudio de la susceptibilidad a scrapie es complicado debido a los diferentes genotipos de PrP encontrados en distintas razas. También es difícil predecir las relaciones entre cambios conformacionales y la existencia de varias cepas infecciosas del agente causal, cada una de ellas con distinta afinidad por el genotipo del hospedador. Antes de aplicar los planes de erradicación de esta enfermedad basados en el genotipo de *PRNP* se debe conocer la distribución de los distintos alelos en las razas autóctonas. Hay que recordar que estos planes se han establecido basándose en los resultados obtenidos en razas europeas, principalmente británicas y francesas. Además puede conllevar cierto riesgo basar todos los esquemas de selección únicamente en los codones 136, 154 y 171. Podría haber variantes genéticas resistentes en poblaciones autóctonas, localizadas en otros codones, que pudieran desaparecer debido a la focalización de los estudios únicamente en estos tres codones.

Otro punto a considerar es la existencia de distintas cepas de scrapie que se diferencian por el período de incubación en ratones con genotipos definidos y la severidad de la distribución de cambios patológicos inducidos en los cerebros de esos ratones. Es importante definir cuántas cepas existen y si se comportan de forma diferente en ovino con distintos genotipos.

Aunque el principal factor de riesgo asociado con scrapie es el genotipo de *PRNP*, es conocido que se trata de una enfermedad transmisible. El trabajo de Foster *et al* utilizando trasplante de embriones genotipados para *PRNP* no sólo confirmaron que las ovejas VRQ/VRQ tiene una sensibilidad muy alta a esta EET, sino también que en algunos animales susceptibles genéticamente, la transmisión de scrapie podía ser bloqueada o el desarrollo de la enfermedad retrasado por factores desconocidos. Esto implica que el scrapie no es una enfermedad puramente genética. Estudios de genotipado en rebaños de Nueva Zelanda indican que los genotipos susceptibles pueden existir sin signos clínicos de la enfermedad. Entonces, aunque en la mayoría de los países aparece el genotipo de *PRNP* como el factor de riesgo, otros factores como es la presencia del agente u otras condiciones aún desconocidas se requieren para el desarrollo de la enfermedad. Una de las líneas de investigación en la genética de las EETs es la búsqueda de otros genes, distintos de *PRNP*, implicados en la susceptibilidad o resistencia a esta enfermedad.

Hay muchos factores a considerar cuando se seleccionan los animales para producción. Entre estos factores se podría incluir la adaptación al medio, la calidad de la lana, ratio de crecimiento, conformación, capacidad maternal, corderos al nacimiento. El genotipado de *PRNP* permite incluir la selección para bajo riesgo a scrapie. La ganancia

para el ganadero sería pequeña si se selecciona hacia un rebaño resistente pero con bajas producciones. Sin embargo, si el ganadero hace frente a un problema de esta enfermedad, la selección de un bajo riesgo tiene una mayor importancia que para un ganadero sin casos descritos. En la actualidad existen investigaciones en marcha destinados a identificar las implicaciones que puede tener la selección para resistencia genética a scrapie en caracteres productivos. En el momento de realizar el genotipado, los machos tienen prioridad sobre las hembras ya que éstos tienen mayor influencia en el desarrollo de caracteres productivos. Una vez seleccionado un grupo basándose en sus características productivas se recomienda realizar el genotipado en este grupo elegido. Si es posible, se debería de evitar la utilización de machos R4 y R5.

Se necesita todavía un gran esfuerzo en el terreno de la investigación de la genética de las EETs para esclarecer todas las cuestiones que todavía sigue generando el tema.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acin C, Martin-Burriel I, Monleon E, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P. PrP polymorphisms in Spanish sheep affected with natural scrapie. *Veterinary Record* 2004, 155: 370-372.
2. Acin C, Martin-Burriel I, Goldmann W, Lyahyai J, Monzón M, Bolea R, Smith A, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *Journal of General Virology* 2004, 85: 2103-2110.
3. Acutis PL, Bossers A, Priem J, Riina MV, Peletto S, Mazza M, Casalone C, Forloni G, Ru G, Caramelli M. Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. *Journal of General Virology* 2006, 87:1029–1033.
4. Agrimi U, Conte M, Morelli L, Di Bari M, Di Guardo, G, Ligios, C, Antonucci, G, Aufiero, GM, Pozzato, N, Mutinelly, F, Nonno, R and Vaccari, G. Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Veterinary Research Communications* 2003, 27: 31-38.
5. Andreoletti O, Lacroux C, Chabert A, Monnereau L, Tabouret G, Lantier F, Berthon P, Eychenne F, Lafond-Benestad S, Elsen JM and Schelcher F. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology* 2002, 83:2607-2616.
6. Bartz JC, McKenzie DI, Bessen RA, Marsh RF and Aiken JM. Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *Journal of General Virology* 1994, 75: 2947-2953.
7. Belt PBGM, Muileman IH, Schreuder BEC, Ruiter J Bos-de, Gielkens ALJ and Smits MA. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology* 1995, 76: 509-517.
8. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA and Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record* 2003, 153: 202-208.
9. Billinis C, Panagiotidis CH, Psychas V, Argyroudis S, Nicolaou A, Leontides S, Papadopoulos O and Sklaviadis T. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *Journal of General Virology* 2002, 83: 713-721.
10. Bossers A, Belt PBGM, Raymond GJ, Caughey B, de Vries R and Smits MA. Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease resistant forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1997, 94: 4931-4936.
11. Buschmann A, Biacabe A, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Lühken G, Baron T and Groschup MH. Atypical scrapie cases in Germany and France are

- identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *Journal of Virological Methods* 2004, 117: 27-36.
12. Cloucard C, Beaudry P, Elsen JM, Milan D, Dussaucy M, Bounneau C, Schelcher F, Chatelain J, Launay JM and Lalanche JL. Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology* 1995, 76: 2097-2101.
 13. Dawson M, Hoinville LJ, Hosie BD and Hunter N. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Veterinary Record* 1998, 142: 623-625.
 14. De Bosschere H, Roels S, Benestad SL & Vanopdenbosch E. Scrapie case similar to Nor 98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Veterinary Record* 2004, 155: 707-708.
 15. Desilva U, Guo X, Kupfer DM, Fernando SC, Pillai AT, Najjar FZ, So S, Fitch GQ, Roe BA. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep. *Cytogenetic Genome Research* 2003, 102: 89-94.
 16. Dickinson A, Meikle V and Fraser H. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology* 1968, 78: 293-299.
 17. Dickinson AG and Meikle VMH. Genetical control of the concentration of ME7 scrapie agent in the brain of mice. *Journal of Comparative Pathology* 1969, 79: 15-21.
 18. Elsen JM, Barillet F, Vu Tien Khang J, Schelcher F, Amigues Y, Laplanche JL, Poivey JP and Eychenne F. Génétique de la sensibilité à la tremblante ovine: recherches en cours et perspectives. *INRA Productions Animales* 1997, 10: 133-140.
 19. Epstein V, Pointing S, Halfacre S. Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Veterinary Record* 2005, 19: 667-668.
 20. Everest SJ, Thorne L, Barnicle DA, Edwards C, Elliott H, Jackman R & Hope J. Atypical prion protein in sheep brain collected during the British scrapie surveillance programme. *Journal of General Virology* 2006, 87: 471-477.
 21. Foster JD and Dickinson AG. The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Veterinary Record* 1988, 123: 5-8.
 22. Gavier-Widen D., Noremark M., Benestad S., Simmons M., Renstrom L., Bratberg B., Elvander M. & Segerstad C. H. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2004, 16: 562-567.
 23. Glockshuber R, Hornemann S, Reik R, Billeter M, Wider G, Liemann S, Zhan R and Wuthrich K. Folding and three-dimensional NMR structure of the recombinant

- cellular prion protein from the mouse. In *Prions: Molecular and Cellular Biology*, pp 1-25. Edited by D.A. Harris. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press 1999.
24. Goldmann W, Hunter N, Foster J, Salbaum JM, Beyreuther K, and Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 1990, 87: 2476-2480.
 25. Goldmann W, Hunter N, Benson G, Foster JD and Hope J. Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *Journal of General Virology* 1991, 72: 2411-2417.
 26. Goldmann W, Hunter N, Smith G, Foster J and Hope J. PrP genotypes and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *Journal of General Virology* 1994, 75: 989-995.
 27. Goldmann W, Martin T, Foster J, Hughes S, Smith G, Hughes K, Dawson M and Hunter N. Novel Polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *Journal of General Virology* 1996, 77: 2885-2891.
 28. Goldmann W, Chong A, Foster J, Hope J and Hunter N. The shortest known prion Protein gene allele occurs in goats, has only three octapeptide repeats and is non-pathogenic. *Journal of General Virology* 1998, 79: 3173-3176.
 29. Goldmann W, Perucchini M, Smith A and Hunter N. Genetic variability of the PrP gene in a goat herd in the UK *Veterinary Record* 2004, 155: 177-178.
 30. Goldmann, W., F. Houston, P. Stewart, M. Perucchini, J. Foster, and N. Hunter. Ovine prion protein variant A136R154L168Q171 increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent. *Journal of General Virology* 2006, 87:3741–3745.
 31. Gombojav A, Ishiguro N, Horiuchi M, Serjmyadag D, Byambaa B and Shinagawa M. Amino Acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian sheep. *Journal of Veterinary Medical Science* 2003, 65: 75-81.
 32. Gordon W. Review of Work on scrapie at Compton, England. United States Department of Agriculture ARS 1966, 91: 1952-1964.
 33. Guo X, Kupfer DM, Fitch GQ, Roe BA and DeSilva U. Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics* 2003, 34: 302-318.
 34. Haase B, Doherr M, Seuberlich T, Drögemüller C, Dolf G, Nicken P, Schiebel K, Ziegler U, Groschup M, Zurbriggen A and Leeb T. *PRNP* promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle *BMC Genetics* 2007, 8:15
 35. Heaton MP, Leymaster KA, Freking BA, Hawk DA, Smith TP, Keele JW, Snelling WM, Fox JM, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. Prion gene sequence variation

- within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mammalian Genome* 2003, 14: 765-777.
36. Hunter N, Foster JD, Dickinson AG and Hope J. Linkage of the gene for scrapie-associated fibril protein (Pr) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Veterinary Record* 1989, 124: 364-366.
 37. Hunter N, Foster JD, Goldman W, Stear MJ, Hope J and Bostock C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Archives of Virology* 1996, 141: 809-824.
 38. Hunter N. PrP genetics in sheep and the application for scrapie and BSE. *Trends in Microbiology* 1997, 5: 331-334.
 39. Johnson C, Johnson J, Clayton M, McKenzie D and Aiken J. Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases* 2003, 39: 576-581.
 40. Kurosaki Y, Ishiguro N, Horiuchi M, Shinagawa M. Polymorphisms of caprine PrP gene detected in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 2005, 67:321–323.
 41. Laplanche JI, Chatelain J, Beaudry P, Dussaucy M, Bounneau C, and Launay JM. French autochthonous scrapied sheep without the 136ValPrP polymorphism. *Mammalian Genome* 1993, 4: 463-464.
 42. Laplanche JL, Chatelain J, Westaway D, Thomas S, Dussaucy M, Brugère-Picoux J and Launay JL. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 1993b, 15: 30-37.
 43. Le Dur A, Béringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TH, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL and Laude H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *PNAS* 2005, 102: 16031-16036.
 44. Lloyd SE, Uphill JB, Torgonski PU, Fisher EM and Collinge J. Identification of genetic loci affecting mouse-adapted bovine spongiform encephalopathy incubation in mice. *Neurogenetics* 2002, 4: 77-81.
 45. Naharro G, Yugueros J, Temprano A, del Rio ML, Rodriguez-Ferri EF and Luengo JM. Prion protein gene polymorphisms in a population of Spanish cows. *Veterinary Record* 2003, 152:212-213.
 46. Onnasch H, Gunn H M, Bradshaw BJ, Benestad SL & Bassett HF. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Veterinary Record* 2004, 155: 636-637.
 47. Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M and Simas JP. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *Journal of General Virology* 2004, 85: 3487-3491.

48. Papasavva-Stylianou P, Kleanthous M, Toumazos P, Mavrikiou P, Loucaides P. Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie. *Veterinary Journal* 2007, 173(2):459–462.
49. Prusiner PB. Prions. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 1998, 95: 13363-133683.
50. Raymond GJ, Bossers A, Raymond LD, O'Rourke KI, Mc Holland LE, Bryant III PK, Miller MW, Williams ES, Smits M and Caughey B. Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease. *The EMBO journal* 2000, 19: 4425-4430.
51. Smits MA, Bossers A and Schreuder BEC. Prion Protein and scrapie susceptibility. *The Veterinary Quarterly* 19: 101-105.
52. Stephens A, Wansg S, Holyoak GR, Timofeevskaja O, Shay TL, Vernon W, Ellis S, Beever J and Cockett N. Characterization of the prion protein (PrP) gene in ten breeds of sheep. *Plant & Animal Genome VI Conference* 1998, January 18-22.
53. Stephenson DA, Chiotti K, Ebeling C, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB and Carlson GA. Quantitative Trait Loci affection prion incubation time in mice. *Genomics* 2000, 69: 47-53.
54. Tranulis MA, Osland A, Bratberg B and Ulvund MJ. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *Journal of General Virology* 1999, 80: 1073-1077.
55. Thorgeirsdottir S, Sigurdarson S, Thorisson HM, Georgsson G and Palsdottir A. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *Journal of General Virology* 1999, 80: 2527-2534.
56. Tuo W, O'Rourke KI, Zhuang D, Cheevers WP, Spraker TR and Knowles DP. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 2002, 99: 6310-6315.
57. Vaccari G, Petraroli R, Agrimi U, Eleni C, Perfetti MG, Di Bari MA, Morelli L, Ligios C, Busani L, Nonno R and Di Guardo G. PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. *Archives of Virology* 2001, 146: 2029-2037.
58. Vaccari G, D'Agostino C, Nonno R, Rosone F, Conte M, Di Bari M, Chiappini B, Esposito E, De Grossi L, Giordani F, Marcon S, Morelli L, Borroni R, and Agrimi U. Prion Protein Alleles Showing a Protective Effect on the Susceptibility of Sheep to Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy. *Journal of Virology* 2007, 81: 7306–7309.
59. Westaway D, Zuliani V, Cooper CM, Da Costa M, Neuman S, Jenny AI, Detwiller L and Prusiner SB. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171

renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes and Development* 1994, 8: 959-969.

60. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, Von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T. and Schatzl M. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *Journal of Molecular Biology* 1999, 289: 1163-1178.
61. Zhang L, Li N, Fan B, Fang M. and Xu W. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds *Animal Genetics* 2004, 35: 457-461.

Otras fuentes de información

1. Carta A, Mura L, Maestrale C, Penna C, Agrimi U, Vaccari G, Conte M, Pernazza I and Ligios C. Allelic frequencies of PrP gene in sarda sheep breed. Conference on methods for control of scrapie. May 2003, Oslo, Norway.
2. Orge L, Pires MA, Galo A and Simas P. Frequency of PRNP alleles in Portuguese sheep breeds. Conference on methods for control of scrapie. May 2003, Oslo, Norway.