

## L'INDAGINE GENETICA

# UN NUOVO IMPEGNO PER IL VETERINARIO NEL CONTROLLO DELLE TSE ANIMALI

Pierluigi Acutis, Simone Peletto, Fabio Zuccon, Silvia Colussi, Maria Caramelli

Centro di referenza per le Encefalopatie Animali (CEA), Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

La scrapie è una patologia ad eziologia infettiva e la suscettibilità alla malattia nella pecora è fortemente influenzata dai genotipi del gene codificante la proteina prionica (PrP). Il gene della PrP mappa sul cromosoma 13, è costituito da tre esoni e la sequenza codificante si trova sul terzo. Studi eseguiti su razze ovine presenti in Europa hanno permesso di rilevare polimorfismi, cioè mutazioni nella sequenza nucleotidica del gene che si traducono in un cambio di aminoacido nella proteina, ai codoni in posizione 112, 116, 127, 136, 137, 138, 141, 151, 154, 167, 168, 171, 175, 176, 180, 189, 195, 196, 211, 241. Solo tre di questi polimorfismi hanno un chiaro effetto sulla suscettibilità alla scrapie, cioè le varianti aminoacidiche ai codoni 136, 154 e 171. Queste tre triplette nucleotidiche polimorfe codificano per sette alleli: A136R154Q171 (ARQ), VRQ, TRQ, ARR, AHQ, ARH, ARK [2, 3, 4, 5, 7, 8, 10]. La frequenza e l'assortimento di questi alleli è differente nelle varie razze, alcune delle quali possiedono tutti gli alleli con relativi genotipi, mentre altre sono caratterizzate dalla presenza dei due soli alleli ARQ e ARR. L'idea dominante è che gli alleli VRQ e ARQ siano associati alla suscettibilità alla scrapie e che l'allele ARR conferisca resistenza: su migliaia di ovini affetti da scrapie ormai studiati in diversi Stati, pochi casi presentavano genotipo ARR eterozigote e solo un caso è stato riportato in Giappone in un animale con genotipo ARR/ARR. L'allele AHQ è per lo più associato a resistenza con dominanza incompleta: studi effettuati su ovini di razza Irlandese e Islandese hanno rilevato che AHQ diminuisce in modo significativo il rischio di sviluppare la malattia. Il ruolo dell'allele ARH è ancora meno chiaro: in omozigosi è considerato a basso rischio, mentre in eterozigosi sembra essere "neutrale", lasciando prevalere l'azione dell'allele a cui si trova associato. Gli alleli ARK e TRQ sono troppo rari per avere dati significativi sulla loro sensibilità alla scrapie. Prendendo in considerazione i cinque

alleli più frequenti, in Gran Bretagna i 15 genotipi derivanti sono stati classificati in 5 categorie di rischio (NSP1-NSP5). Viene considerato resistente il genotipo ARR/ARR, semiresistenti i genotipi ARR/XXX (dove per XXX si intende qualsiasi degli altri alleli eccetto VRQ) e altamente suscettibili i genotipi VRQ/XXX. Sulla base di questa classificazione l'Unione Europea ha deciso di utilizzare la genetica per controllare le EST ovine. A seguito della Decisione 2003/100/CE [6], ogni Stato Membro ha introdotto un piano di selezione genetica per la resistenza alle EST ovine con lo scopo di aumentare la frequenza dell'allele ARR e ridurre gli alleli suscettibili. In Italia è stato emanato il Decreto Ministeriale 17 dicembre 2004, in base al quale si dovranno selezionare, su base inizialmente volontaria e quindi obbligatoria dall'aprile 2005, gli ovini di razza pura iscritti ai libri o di particolare valore genetico al fine di aumentare la frequenza dell'allele ARR, eliminare VRQ e ridurre ARQ. Tale obiettivo verrà perseguito attraverso un programma di selezione che prevede le seguenti modalità operative:

- Genotipizzazione di tutti i maschi riproduttori
- Eliminazione dei portatori dell'allele VRQ
- Eventuale genotipizzazione delle femmine con eliminazione di quelle portatrici dell'allele VRQ
- Impiego mirato dei riproduttori ai fini del raggiungimento delle qualifiche

Ci si propone in tal modo di arrivare ad una certificazione delle greggi in base al loro livello di resistenza genetica alle EST. I livelli minimi previsti dalla Decisione sono i seguenti:

Liv.I: greggi con tutti ovini ARR/ARR

Liv.II: ovini tutti ARR/— e montoni ARR/ARR

Liv.III: greggi con progenie discendente da montoni ARR/ARR

Liv.IV: greggi con progenie discendente da montoni ARR/—

Liv.V: aderenti al piano

In adempimento a quanto previsto dal piano Nazionale

ciascuna regione ha avviato la caratterizzazione genetica delle razze ovine autoctone al fine di acquisire i dati necessari all'introduzione di piani di selezione genetica. Il Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta ha svolto, in collaborazione con la Regione Piemonte, un'indagine sulle frequenze alleliche e genotipiche del gene della PrP di 1876 arieti puri o incroci, appartenenti alle razze Biellese (n=1207), Delle Langhe (n=265), Frabosana (n=171) e Sambucana (n=197). I risultati mostrano che la frequenza dell'allele ARR resistente è relativamente alta (32-36%) nelle razze Delle Langhe, Frabosana e Sambucana, anche se risulta una frequenza inferiore a quella riscontrata in altre importanti razze ovine italiane quali la razza Sarda (ARR=39%), Comisana (ARR=41,1%) e Massese (ARR=45,9%). La selezione per la resistenza alla scrapie nella razza Biellese dovrà considerare invece la bassa frequenza dell'allele ARR (8,3%), che sembra anche essere soggetto a selezione negativa da parte degli allevatori. Nella razza Biellese, oltre ai cinque alleli più comuni (VRQ, ARQ, ARR, AHQ e ARH), è stato rilevato l'allele raro ARK, alle frequenze più alte mai riportate in una razza ovina [1].

L'estensione delle analisi genetiche in tutta Europa e il miglioramento delle capacità diagnostiche stanno dimostrando che la classificazione di rischio dei genotipi e degli alleli può variare con: 1) ceppo di agente infettante; 2) presenza di polimorfismi diversi dai 3 codoni classicamente considerati; 3) razza ovina considerata. La genetica delle EST ovine non presenta quindi un quadro certo ed assoluto ma varia con le diverse combinazioni tra agente infettante e ospite.

Recentemente sono state identificate forme atipiche di scrapie, caratterizzate da fenotipi immunobiochimici della proteina prionica patologica (PrP<sup>sc</sup>) diversi da quello classico, da diversa distribuzione della PrP<sup>sc</sup> nel sistema nervoso centrale e da minore diffusibilità all'interno delle greggi colpite. Queste forme atipiche sono probabilmente provocate da diversi ceppi di prioni, uno dei quali è stato ben caratterizzato in Norvegia ed è stato denominato Nor98. Esse hanno interessato animali con genotipi diversi da quelli colpiti dalla scrapie classica, tra cui ovini con l'allele resistente ARR sia in eterozigosi che in omozigosi. Uno studio effettuato da Moum et al. [9] in Norvegia ha rivelato come la suscettibilità genetica al Nor98 sia diversa da quella alla scrapie classica e che nel caso di questo nuovo ceppo la maggiore suscettibilità sia data dall'allele AHQ e da un polimorfismo al codone 141 (da Leucina a Fenilalanina). Infatti, 36 dei 38 casi studiati presentavano almeno uno di questi alleli, in alcuni casi anche associati all'allele resistente ARR; sembra quindi che in relazione al Nor98 l'allele ARR in eterozigosi non sia dominante nel conferire resistenza, al contrario di quanto avviene nella scrapie. I dati a disposizione non sono ancora sufficienti per stimare se ARR dia un grado inferiore di resistenza al Nor98 oppure non dia affatto resistenza. In Italia nel 2005 sono stati rilevati 5 casi di scrapie atipica nell'ovino: 2 AF141RQ/ARR, 1 AF141RQ/ARQ, 1 ARQ/AHQ, 1

ARR/AHQ. Quindi anche in Italia, come in Norvegia, sono stati colpiti animali con l'allele ARR ma con presenza sempre delle mutazioni al 141 o al 154. La diversa suscettibilità genetica al Nor98 non permette di escludere conseguenze sulla selezione genetica avviata per la scrapie classica. È possibile che selezionando l'allele ARR si crei una popolazione di animali resistenti alla scrapie classica, ma suscettibili a quella atipica. D'altro canto non è ancora nota l'importanza della scrapie atipica, che da alcuni è ritenuta sporadica. E' quindi essenziale continuare gli studi su questi ceppi atipici per comprenderne meglio l'epidemiologia, la patogenesi e la genetica al fine di valutare l'impatto di una loro diffusione e la necessità di un loro controllo.

## Bibliografia

- 1-Acutis P.L., Sbaiz L., Verburg F., Riina M.V., Ru G., Moda G., Caramelli M., Bossers A. (2004) Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. *J. Gen. Virol.* 85: 3165-3172.
- 2-Agrimi, U., Conte, M., Morelli, L. & 9 other authors (2003). Animal Transmissible Spongiform Encephalopathies and Genetics. *Vet Res Commun Suppl* 1, 31-38.
- 3-Belt B.G.M., Bossers A., Schreuder B.E.C., Bos-de-Ruijter J., Gielkens A.L.K. & Smits M.A. (1996) PrP allelic variants associated with natural scrapie. In *Bovine Spongiform Encephalopathy, the BSE Dilemma*. pp.294-305.
- 4-Belt B.G.M., Muileman J.H., Schreuder B.E.C., Bos-de-Ruijter J., Gielkens A.L.K. & Smits M.A. (1995) Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 77: 1347-1399.
- 5-Billinis C., Psychas V., Leontides L., Spyrou V., Argyroudis S., Vlemmas I., Leontides S., Sklaviadis T. & Papadopoulos O. (2004) Prion protein gene polymorphism in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol*, 85: 547-554.
- 6-Decisione della Commissione n° 100 del 13 febbraio 2003 che fissa requisiti minimi per l'istituzione di programmi d'allevamento di ovini resistenti alle encefalopatie spongiformi trasmissibili. [http://europa.eu.int/eur-lex/pri/it/oj/dat/2003/l\\_041/l\\_04120030214it00410045.pdf](http://europa.eu.int/eur-lex/pri/it/oj/dat/2003/l_041/l_04120030214it00410045.pdf).
- 7-Goldmann W., Hunter N., Foster J.D., Salbaum M., Beyreuther K. & Hope J. (1990) Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 2476-2480.
- 8-Guo X., Kupfer D.M., Fitch C.Q., Roe B.A. & DeSilva U. (2003) Identification of a novel lysine-171 allele in the ovine prion protein (PRNP) gene. *Anim Genet*, 34: 302-318.
- 9-Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*. 86, 231-5.
- 10-Zhang, L., Li, N., Fan, B., Fang, M. & Xu, W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet.*, 35, 457-461.