

## **ESTIMACIÓN DE FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA LOS CODONES 136, 154 Y 171 DEL GEN PRNP OVINO A PARTIR DE LECHE DE TANQUE MEDIANTE UN PROCEDIMIENTO RT-PCR**

Morán, J.A., Álvarez, L., DE la Fuente, L.F., Gonzalo C., San Primitivo, F. y Arranz J.J.  
Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071  
León E-mail: jamorp@unileon.es

### **INTRODUCCIÓN**

Desde el año 2003, con la directiva CE2003/100/EC (Comisión Europea, 2003), se hace obligatorio incluir, en los programas de selección ovina, la resistencia frente al scrapie clásico, como un objetivo complementario. Para cumplir esta exigencia, se han adaptado los programas de selección, incluyendo como criterio el genotipo para el gen PRNP. Por otra parte, desde el año 2008 distintas investigaciones han detectado que, en las ovejas con la enfermedad, la leche puede ser portadora de concentraciones importantes de la proteína infectiva (Konold et al., 2008; Lacroux et al., 2008). Este hecho plantea diversos interrogantes, con respecto al riesgo de exposición a las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), asociadas con leche y productos lácteos procedentes de ovejas o de otras especies lecheras susceptibles a EET. Ante esta situación, algunos países de la Unión Europea solicitan certificaciones de origen de la leche que importan, con fines preventivos.

En este contexto, y partiendo de la relación existente entre la resistencia al scrapie y la estructura del gen PRNP, resulta de especial interés conocer la frecuencia de los alelos del gen PRNP, en los rebaños de ganado ovino, con el fin de evaluar la capacidad de resistencia o susceptibilidad genética de la población lechera ante esta enfermedad. Para ello, nos proponemos optimizar un método que permita estimar las frecuencias alélicas, para el gen PRNP, de una forma rápida y segura, utilizando una muestra de leche de tanque. El objetivo final es conocer, concretamente, las frecuencias para las variantes genéticas que afectan a los codones 136, 154 y 171, relacionados con la resistencia al scrapie clásico.

Este estudio se enmarca dentro del proyecto europeo denominado RISKSCRA, realizado por investigadores e industrias lácteas de Italia, Grecia, Croacia y España (con la participación de la Universidad de León). El objetivo de este proyecto es poner a punto un protocolo comercial que permita analizar el nivel de resistencia al scrapie y certificar el estatus de diferentes rebaños y su evolución a lo largo del tiempo.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para estimar la fiabilidad del método propuesto se han analizado 3 ganaderías ovinas especializadas en la producción de leche (TM, AL y VP), cuyos animales estaban genotipados para los codones 136, 154 y 171 del gen PRNP. El mismo día en que se realizó el control lechero oficial, se acudió a las diferentes explotaciones y se anotó la identificación de los animales que estaban en lactación. Simultáneamente, se tomó una muestra de 200 ml de leche de tanque, después de una homogenización cuidadosa de la leche presente. A partir de los datos oficiales de control lechero se obtuvieron las producciones y el recuento de las células somáticas de cada uno de los animales que habían sido ordeñados y que, por lo tanto, habían contribuido a la leche muestreada.

#### Asilamiento de ADN:

La muestra de leche de tanque se ha dividido en cuatro réplicas de 50 ml y se ha procedido a la extracción de DNA de las células somáticas, aisladas mediante una centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos. El sedimento se lava con 1 ml de tampón de lisis y se digiere con Proteinasa K durante 4 horas a 42 °C. El DNA se aísla utilizando el kit *NucleoSpin Food®* de Macherey Nagel, siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### Determinación de las frecuencias alélicas

Para la determinación de las frecuencias alélicas, en cada uno de los 3 codones, se ha diseñado un protocolo de PCR cuantitativa. La secuencia de los *primers* y las sondas específicas de alelo para las dos cadenas se presentan en la Tabla 1.

Para cada posición a interrogar, se utiliza una curva patrón con concentraciones decrecientes (1/10) de DNA (desde 30 ng/μl hasta 0,03 ng/μl), incluyendo al menos tres puntos para la calibración de la recta. La recta de calibración se ha realizado para los dos alelos de cada locus. Con objeto de evitar sesgo, por las posiciones en la placa, se ha

realizado una amplificación por triplicado. La descripción del método utilizada esta detallada en Pfaffl (2001).

**Tabla 1.** *Primers utilizados en la RT- PCR y sondas de discriminación alélica en los tres codones analizados del gen PRNP.*

Codon	Secuencia (5'-3')	Sonda discriminación alélica
136 A/V	CTGCAGCTGGAGCAGTGGTA	<b>A:</b> TCATGgCACTTCC
	GATAGTAACGGTCCTCATAGTCATTGC	<b>V:</b> CTCATGaCACTTCC
154 R/H	GATCCACTGGTCTGTAGTACACTTGG	<b>R:</b> CCGTTACTATCgTGAAAA
	CATGAGCAGGCCTCTTATACATTTT	<b>H:</b> CGTTACTATCaTGAAAAC
171 R/no R	TGTTGACACAGTCATGCACAAAG	<b>R:</b> CCAGTGGATCgGTATA
	GTTACCCCAACCAAGTGTACTACAGA	<b>No R:</b> ACCAGTGGATCagTATA

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la baja frecuencia, en los rebaños analizados, del alelo Valina en el codón 136, no se ha detectado variabilidad en este codón y los resultados presentados hacen referencia a los codones 154 y 171. En el codón 171 únicamente se ha discriminado el alelo que confiere mayor resistencia al scrapie clásico "R" frente al resto de las variantes que se han detectado en dicho locus (Q, H y K).

En la Figura 1, se representan las frecuencias estimadas, mediante el procedimiento de RT-PCR, y las esperadas en función del genotipo individual. Como se puede observar, en todos los casos existe una buena aproximación de los valores estimados frente a los esperados. Así, en el codón 154, las frecuencias porcentuales observadas para el alelo H son de 3,75 %; 1,94 % y 3,28 %; frente a 3,3 %; 1,53 % y 2,80 % para las explotaciones TM, AL y VP, respectivamente. En el caso del alelo R del locus 171, los valores observados son de 32,83 %; 13,84 % y 24,9 % y los esperados en las mismas explotaciones, de 29,90 %; 15,45 % y 24,41 %. En ninguno de los casos las diferencias han resultado significativas (diferencias estimadas con el estadígrafo de contraste Z).

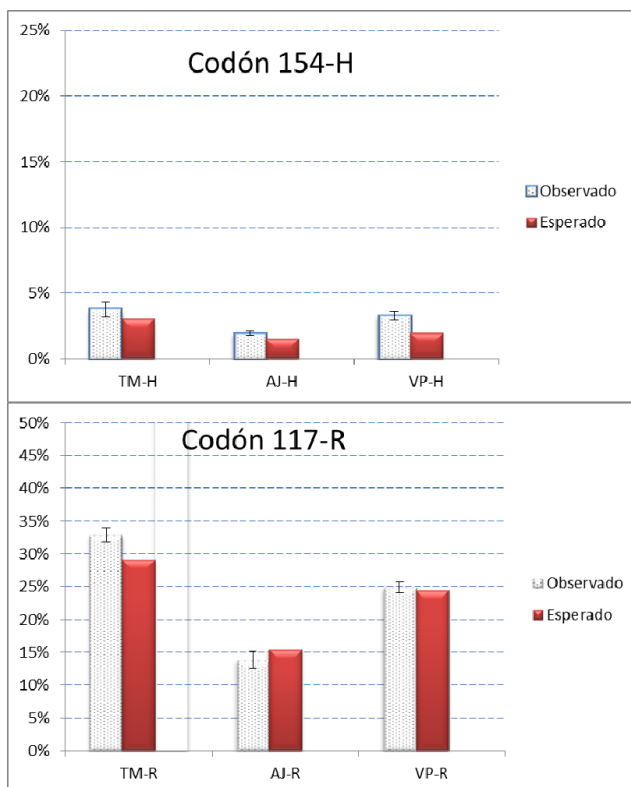
Por lo que respecta a la repetibilidad del método, los coeficientes de variación estimados para las cuatro repeticiones que se realizan de cada determinación, alcanzaron valores que oscilaron entre 0,01% y 0,18%, lo que deja clara la escasa variabilidad encontrada en las repeticiones.

El método utilizado permite, por lo tanto, de una forma sencilla, rápida y barata, estimar la proporción de animales portadores de cada uno de los alelos presentes en un rebaño, para valorar, de una forma aceptablemente precisa, su riesgo para el scrapie clásico. Como se ha indicado, algunos países solicitan información sobre el estatus de los rebaños de los que procede la leche que adquieren, en relación con su capacidad de resistencia al scrapie. El método que hemos desarrollado, y aquí presentamos, puede resultar útil, no solo para cumplir el requisito solicitado, sino para conocer la estructura de un rebaño respecto al gen PRNP y decidir los genotipos más adecuados para los sementales destinados a padres de los animales de reposición.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Comisión europea. 2003. 2003/100/EC. Official Journal L041: 41-45.
- Gonzalo, C., Pérez-Bilbo, M., García-Jimeno, M.C. & Arranz, J.J. 2010. Revista del Consorcio de Promoción del Ovino, Nº 4.
- Konold, K., Jo Moore, S., Bellworthy, S.J. & Simmons, H.A.. 2008. BMC Vet. Res. 4:14.
- Lacroix, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillat, S. et al. 2008. PLoS Pathogens 4, issue 12, e1000238
- Pfaffl, N.W. 2001 Nucleic AcidS Res. 29: 2002-2007.

**Agradecimientos:** Este trabajo forma parte del proyecto RISKSCRA financiado por la UE (COOL-CT-2006-030278) y por el gobierno autonómico de Castilla y León (Junta de Castilla y León) a través de la financiación a grupos de excelencia en investigación (GR43)..



**Figura 1.** Representación de las frecuencias alélicas para el alelo H en el loci 154 y el R en el 171 del gen PRNP. En azul se presentan las frecuencias estimadas a partir del análisis de la leche de tanque con el método de PCR a tiempo real (RT-PCR) y en rojo las esperadas en función de los genotipos individuales de los animales presentes durante el ordeño.

#### ESTIMATION OF ALLELE FREQUENCIES FOR CODONS 136, 154 AND 171 AT PRNP GENE BY RT-PCR IN BULK TANK MILK IN DAIRY SHEEP

**ABSTRACT:** The aim of this work is to develop new analytical tools to assess and quantify scrapie risk in sheep milk and to implement their application in field conditions. For this purpose a Real time PCR procedure was developed in order to estimate allele frequencies at codons 136, 154 and 171 in the PRNP gene in commercial ovine flocks using DNA isolated from bulk tank milk. To evaluate the reliability of this method a comparison between the frequencies estimated from the Real Time-PCR procedure and frequencies expected on the basis of individual genotyping of lactating ewes of the flock was performed and no significant differences were detected. The method was consistent estimating flock frequencies both for medium and extreme values of frequencies. As conclusion this procedure is an efficient tool for understanding the scrapie protective status of the flock.

**Keywords:** Scrapie resistance, Bulk milk, sheep