

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Marko PLOHL

**NAPOVEDOVANJE GENOTIPA PrP PRI OVCAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Marko PLOHL

**NAPOVEDOVANJE GENOTIPA PrP PRI OVCAH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**PREDICTION OF PrP GENOTYPE IN SHEEP**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo na Katedri za govedorejo, rejo drobnice, perutninarstvo, akvakulturo in sonaravno kmetijstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Dragomirja Kompana in za somentorja prof. dr. Jurija Poharja.

Recenzent: prof. dr. Peter Dovč

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Antonija HOLCMAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Dragomir KOMPAN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Jurij POHAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter DOVČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum

zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Marko Plohl

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 636.3:636.09(043.2)=163.6
- KG ovce/bolezni/praskavec/genotip PrP/skupina NSP/segregacijska analiza/ verjetnost genotipov
- KK AGRIS L73/5240
- AV PLOHL, Marko
- SA KOMPAN, Dragomir (mentor)/POHAR, Jurij (somentor)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2008
- IN NAPOVEDOVANJE GENOTIPA PrP PRI OVCAH
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP VIII, 62 str., 15 pregl., 13 sl., 1 pril., 79 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Uporabili smo segregacijsko analizo za izračun verjetnosti genotipov pri ovcah z neznanim genotipom PrP v Sloveniji. V analizo smo zajeli 36,083 ovc in ovnov različnih pasem. Genotip PrP s petimi različnimi aleli je bil znan pri 10,309 živalih. Struktura porekla in podatkov z genotipi PrP se je med pasmami razlikovala. Verjetnosti genotipov smo izračunali z metodo alelnega luščenja in modelom nepopolne penetrance ločeno za vsako pasmo. Iz rezultatov smo izračunali verjetnosti za skupine NSP (National Scrapie Plan) in povprečno skupino NSP. Rezultati se nanašajo le na žive živali. Z gotovostjo nismo dodatno potrdili genotip PrP ali skupino NSP niti za eno žival. Za 0 do 5,5 % živali različnih pasem smo lahko dodatno potrdili genotip PrP s 95 % verjetnostjo. Skupino NSP smo lahko z enako verjetnostjo dodatno potrdili za 0,5 do 34,9 % živali različnih pasem. Menimo, da so vzroki za slab uspeh: veliko število alelov, intermediarne frekvence alelov, struktura podatkov in uporaba modela nepopolne penetrance. Dodatne potrditve genotipa PrP in skupine NSP predstavljajo prihranek, a zaradi majhnega obsega niso uporabne za selekcijo celotne pasme na odpornosti proti praskavcu. V ta namen lahko uporabimo povprečno skupino NSP, ki jo lahko izračunamo za vse živali.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 636.3:636.09(043.2)=163.6
- CX sheep/diseases/scrapie/PrP genotype/NSP group/segregation analysis/genotype probabilities
- CC AGRIS L73/5240
- AU PLOHL, Marko
- AA KOMPAN, Dragomir (supervisor)/POHAR, Jurij (co-supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2008
- TI PREDICTION OF PrP GENOTYPE IN SHEEP
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO VIII, 62 p., 15 tab., 13 fig., 1 ann., 79 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Segregation analysis was used to infer genotype probabilities in Slovenian sheep without PrP genotype data. Altogether 36,083 ewes and rams of various breeds were included. PrP genotype with five different alleles was known for 10,309 animals. Pedigree and genotype data structure differed between breeds. Allelic peeling with incomplete penetrance model was used for the calculation of genotype probabilities for each breed separately. Additionally, NSP (National Scrapie Plan) group probabilities and the average NSP group were calculated from genotype probabilities. Results are based on live animals only. There were none additional identifications with certainty for PrP genotype or NSP group. With 95 % probability PrP genotype was additionally identified for 0 to 5.5 % animals of different breeds. NSP group was additionally identified with the same probability for 0.5 to 34.9 % animals of different breeds. We assume that the low number of additional identifications was due to: large number of alleles, intermediate allele frequencies, data structure and the use of incomplete penetrance model. Additional identifications provide cost savings, but are not useful for the selection of entire breed for scrapie resistance. The average NSP group can be used instead, since it can be calculated for all the animals.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI) .....	III
Key Words Documentation (KWD) .....	IV
Kazalo vsebine .....	V
Kazalo preglednic .....	VII
Kazalo slik .....	VIII
Kazalo prilog .....	IX
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 PRIONSKE BOLEZNI .....	2
2.2 PRASKAVEC .....	3
2.3 PRIONI .....	5
2.4 PRP GEN .....	8
2.5 ZATIRANJE PRASKAVCA .....	10
2.6 SEGREGACIJSKA ANALIZA .....	16
<b>3 PRIKAZ ALELNEGA LUŠČENJA .....</b>	<b>17</b>
3.1 ENOSTAVNI SKLEPI .....	18
3.2 PRIKAZ DELOVANJA ALELNEGA LUŠČENJA .....	20
<b>3.2.1 Prvi korak .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2 Drugi korak .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.3 Tretji korak .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.4 Četrty korak .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2.5 Peti korak .....</b>	<b>24</b>
3.3 PRIMERJAVA SKLEPOV O RODOVNIKU IN REZULTATOV ALGORITMA .....	25
3.4 MODEL NEPOPOLNE PENETRANCE .....	26
<b>3.4.1 Iterativno alelnu luščenje .....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>31</b>
4.1 MATERIAL .....	31

4.2	METODE .....	32
<b>5</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>35</b>
5.1	FREKVENCE ALELOV .....	35
5.2	USPEŠNOST DOLOČITVE GENOTIPA PrP IN SKUPINE NSP .....	37
<b>5.2.1</b>	<b>Uspešnost določitve genotipa PrP .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Uspešnost določitve skupine NSP .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Razprava uspešnosti določitve genotipa PrP in skupine NSP .....</b>	<b>41</b>
5.3	POVPREČNA VREDNOST NSP .....	44
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>52</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Prenosljive spongiformne encefalopatije pri ljudeh in živalih (Jung, 1996).....	3
Preglednica 2: Polimorfizmi na genu PrP in 5 najpogostejših alelov pri ovcah (Hunter, 2007).....	9
Preglednica 3: Dovzetost/Odpornost ovc na praskavec glede na genotipe PrP (Hunter, 2007) .....	10
Preglednica 4: Skupine NSP (Dawson in sod., 2008).....	12
Preglednica 5: Spremembe v frekvencah alelov po uvedbi programa selekcije na genotip PrP v tropih po Veliki Britaniji (Dawson in sod., 2008) .....	14
Preglednica 6: Verjetnost genotipov za osebek I.....	24
Preglednica 7: Verjetnosti genotipov za osebek I.....	25
Preglednica 8: Verjetnosti genotipov za osebek I.....	26
Preglednica 9: Izračun verjetnosti genotipov in alelov za osebek A s popolno in nepopolno penetranco.....	28
Preglednica 10: Struktura podatkov .....	32
Preglednica 11: Frekvence alelov PrP (%) in heterozigotnost (He) po pasmah .....	36
Preglednica 12: Frekvence skupin NSP (v %) po pasmah.....	36
Preglednica 13: Število dodatno potrjenih ali ovrženih genotipov PrP pri različnih verjetnostih po pasmah .	39
Preglednica 14: Število dodatno potrjenih ali ovrženih skupin NSP pri različnih verjetnostih po pasmah.....	41
Preglednica 15: Odstotek živali z neznanim genotipom PrP, ki so pod povprečno vrednostjo NSP v populaciji.....	46



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Primer ovce obolele s praskavcem: odpadla dlaka in problemi z zadnjimi nogami (The rationale ..., 2008) .....	4
Slika 2: Tridimenzionalna slika priona, levo normalen prion, desno patogen prion (Prion Protein PrP, 2008) .....	6
Slika 3: Kopičenje spremenjenih prionov (PrP <sup>Sc</sup> ) v možganih (Prion Lab, 2008) .....	7
Slika 4: Sprememba frekvence (v %) skupin NSP (National Scrapie Plan) od začetka uvedbe programa selekcije (2002) in letom 2006 (Dawson in sod., 2008).....	14
Slika 5: Primer rodovnika za prikaz delovanja algoritma (Thallman in sod., 2001a) .....	18
Slika 6: Prvi korak luščenja rodovnika - končni starši, prvič .....	20
Slika 7: Drugi korak luščenja rodovnika - končni potomci, prvič .....	21
Slika 8: Tretji korak luščenja rodovnika - končni starši, drugič .....	22
Slika 9: Četrty korak luščenja rodovnika - končni potomci, drugič .....	23
Slika 10: Peti korak luščenja rodovnika- analiziran osebek (I) .....	24
Slika 11: Primer rodovnika za prikaz modela nepopolne penetrance.....	27
Slika 12: Alelno luščenje in zanka v rodovniku .....	30
Slika 13: Porazdelitev živali glede na povprečno vrednost NSP po pasmah stolpci – živali z znanim genotipom PrP, naložena krivulja – živali z neznanim genotipom PrP, naložena krivulja – živali z neznanim genotipom PrP, navpična črtkana črta –povprečna vrednost NSP v populaciji $\left(\overline{NSP_p}\right)$ .....	45

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Frekvence genotipov PrP pri različnih pasmah ovc po Sloveniji

## 1 UVOD

Človek je drobnico udomačil pred okrog 10 000 leti. Redili so jo posamezno ali v tropih in skozi stoletja se je ta panoga razvila po vsem svetu. Rejci drobnice so se skozi zgodovino srečevali z najrazličnejšimi boleznimi. Med te bolezni uvrščamo tudi praskavec, obolenje ovc, za katerega še danes ne poznamo zdravila.

Praskavec je bolezen drobnice, ki jo v angleško govorečih državah bolj poznajo pod imenom scrapie. Gre za kronično obolenje ovc, ki se vedno konča s smrtjo. Praskavec spada v skupino prenosljivih spongiformnih encefalopatij (ang. kratica TSE), katerim pravimo tudi prionske bolezni. Prionske bolezni so skupina bolezni, pri katerih se v centralnem živčnem sistemu kopiči spremenjena oblika prionske beljakovine, kar pozneje vedno povzroči smrt. Primarnega povzročitelja do danes še ne poznamo. Praskavec je bil prvič opisan že davnega leta 1732 v Veliki Britaniji in velja za najstarejšo opisano bolezen iz skupine prionskih bolezni. Zadnje čase veliko prahu v javnosti dviguje goveja spongiformna encefalopatija (ang. kratica BSE), prionska bolezen, pri kateri obstajajo namigi o možnosti prenosa na človeka. Z izbruhom BSE-ja je postal pomemben tudi praskavec, saj obstaja domneva o možnem prenosu patogenih prionov iz trupel ovac obolelih za praskavcem na govedo krmljeno s predelano kostno-mesno moko iz trupel ovac obolelih za praskavcem. S časom so znanstveniki odkrili gen PrP, ki ga povezujejo z dovzetnostjo oziroma odpornostjo na praskavec. Ta gen z različno dovzetnimi aleli je postal osnova za zatiranje praskavca po svetu. Po odkritju gena PrP se je v sklopu rejskih programov pričela genotipizacija ovc po celem svetu z namenom zatiranja praskavca. Ta metoda je učinkovita, vendar počasna in finančno precej zahtevna. Zato smo v sklopu te naloge poskušali poiskati dodatne načine za določanje genotipa PrP na podlagi genotipa sorodnikov. S pomočjo segregacijske analize smo izračunali verjetnosti posameznih genotipov za negenotipizirane živali. Ta izračun temelji na informacijah o rodovniku posamezne živali in genotipa sorodnikov. Z napovedovanjem genotipa PrP za negenotipizirane živali bi prihranili ker nekaj dela in finančnih sredstev, ki so potrebna za genotipizacijo živali.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PRIONSKE BOLEZNI

Praskavec spada v skupino prenosljivih spongiformnih encefalopatij ali tudi prionskih bolezni. Že samo ime nam pove, da izbruh teh bolezni povezujejo s prioni. Gre za posebno obliko beljakovine, normalno prisotne v celicah, ki se pod določenimi pogoji spremeni in postane patogena. Patogeni prioni se začnejo kopičiti v centralnem živčnem sistemu, predvsem možganih in tako povzročajo prionske bolezni. Prionske bolezni so tesno povezane z nevropatologijo, saj so zanje značilne spongiformne spremembe in vakuolizacija v možganih, strogljoza, nevronska degeneracija ter odlaganje amiloida o čemer poroča Jung (1996). Zaradi poškodb, ki se pojavljajo v možganih, se postopoma pojavljajo klinični znaki, ki so odvisni od tega, kateri del možganov je prizadet. Inkubacijska doba je dolga in se vedno konča s poginom (Juntas, 2004).

Prionske bolezni so ugotovljene ne le pri živalskih vrstah, ampak tudi pri človeku. Tako med humane prionske bolezni štejemo bolezen Kuru, Creutzfeldt-Jacobovo bolezen, Gerstmann-Straussler-Scheinkerjev sindrom in še nekatere druge. Pri živalih so najbolj znane prionske bolezni praskavec (ovce, koze), goveja spongiformna encefalopatija (ang. kratica BSE) (govedo), kronična bolezen kopitarjev (jelenjad), prenosna kunčja encefalopatija in druge encefalopatije, ki prizadenejo gamse, muflone, afriške antilope, domače mačke, pume in geparde (Jung, 1996) (Preglednica 1).

Javnosti je najbolj poznana goveja BSE, bolj jo poznamo pod imenom bolezen norih krav. BSE so prvič identificirali leta 1986 v Veliki Britaniji. Študije so vzrok za izbruh BSE-ja iskale v opuščanju ekstrakcije z organskimi topili in znižanju temperature pri sterilizaciji v tovarnah kostno-mesne moke. Postopek pridobivanja kostno-mesne moke so v tovarnah spremenili z namenom pridobivanja več kalorij in s tem posledično zvišanje prehranske vrednosti kostno-mesne moke. Ta sprememba tehnologije predelave pa ni pomenila le zvišanja prehranske vrednosti, ampak naj bi s tem omogočili tudi »preživetje« patogene oblike priona. Po nekaterih domnevah naj bi vir patogenih prionov predstavljala trupla ovac, obolela za praskavcem, ki so bila vključena v predelavo. Takšno predelano kostno-mesno moko so rejci dodajali govedu kot krmni dodatek, kar je pripeljalo do prvih

izbruhov bolezni v drugi polovici 80. let prejšnjega stoletja v Veliki Britaniji (Smith in Bradley, 2003).

Preglednica 1: Prenosljive spongiformne encefalopatije pri ljudeh in živalih (Jung, 1996)

Bolezen	Vrsta	Leto opisa bolezni
Praskavec	Ovce, koza	1772
Creutzfeld-Jacobova bolezen	Človek	1920-1921
Gerstmann-Straussler-Scheinkerjev sindrom	Človek	1936
Alperjeva bolezen	Človek	1931
Kuru	Človek (Nova Gvineja)	1957
Prenosna kunja encefalopatija	Kuna	1964-1965
Kronična bolezen kopitarjev	Jelenjad	1980
Familiarna insomnija	Človek	1986
Bovina spongiformna encefalopatija (BSE)	Govedo	1986
Praskavcu podobne encefalopatije	Gamsi, Mufloni, domača mačka, Puma, Gepard	1988-1992

Nekateri dokazi govorijo o tem, da se bolezen prenaša tudi na ljudi, ki so zaužili okuženo goveje meso. Na ljudeh se odraža kot nova oblika Creutzfeldt-Jakobove bolezni (ang. kratica vCJD ali tudi nvCJD) (Variant Creutzfeld-Jacob ..., 2008a). Za to boleznijo bi naj do sedaj umrlo približno 200 ljudi po vsem svetu (Variant Creutzfeld-Jacob ..., 2008b).

## 2.2 PRASKAVEC

Praskavec je najstarejša opisana bolezen iz skupine prionskih bolezni. Prvič je bil omenjen že v 18. stoletju, natančneje leta 1732, ko na območju Velike Britanije zabeležili in opisali prvi primer tega obolenja (Poser, 2001). V začetku 20. stoletja, še posebej po 2. svetovni vojni, se je zaradi povečanega trgovanja z plemenskimi živalmi praskavec razširil po vsem svetu. Tako so sčasoma primere praskavca zabeležili skorajda povsod. Status držav, kjer praskavec ni prisoten trenutno uživata le Avstralija in Nova Zelandija. Obe državi sta ob izbruhu praskavca leta 1952 in 1954 uvedli visoke standarde uvoza drobnice ter zakol živali, ki so bile v stiku z obolelimi. S temi ukrepi so preprečili prenos praskavca v trope po državi. Tej dvojici se v zadnjih letih poskuša pridružiti še Južnoafriška republika, ki trdi da so praskavec dokončno iztrebili že leta 1972 (Gorjanc in Kompan, 2005). V Sloveniji je bil prvi primer praskavca diagnosticiran julija 2004 (Juntos in Pogačnik, 2004). Do sedaj je

bilo obolenje odkrito v šestih rejah, potrjenih pa je bilo 163 primerov, ki so bili vsi med sabo epizootiološko povezani (VURS, 2007).

Praskavec je bolezen, ki ovira normalno delovanje možganov. Zanj so značilni dolga progresivni potek, nekoordinirane kretnje, hiperestezija, močno srbenje, pareze in paralize. Značilna je daljša inkubacijska doba, saj je bilo največ primerov praskavca zabeleženih pri starosti od 2 do 5 let. Znani pa so tudi primeri pri mlajših živalih. Klinični znaki bolezni se razvijajo zelo počasi in različno od živali do živali. Začetni znaki bolezni so povezani s spremembo v obnašanju, zaradi česar ga je v začetni fazi zelo težko diagnosticirati. Tako se v začetnem stadiju bolezni obolele živali ločijo od tropa oziroma rahlo zaostajajo za tropom, postanejo pa tudi precej nervozne, agresivne, zaspane ter nekoliko zmedene. Pozneje se začnejo pojavljati še drugi znaki praskavca: podrhtavanje glave in vratu, stresanje z glavo in značilno gibanje ustnic. Pojavi se močno srbenje, najprej na zadnjih delih, pozneje pa po vsem telesu ter drgnjenje ob različne objekte. Živali se praskajo tako da odpade volna, pozneje se celo grizejo in na koži nastanejo razne poškodbe. Po praskanju je bolezen tudi dobila ime. Pojavljati se začnejo še nekoordinirane kretnje, pareze ter paralize, značilen je pojav zanašanje zadnjih nog (Slika 1). Takšne bolezenske znake lahko žival kaže od nekaj tednov pa do več mesecev, na koncu pa vedno poginejo (Clinical signs of scrapie, 2008).



Slika 1: Primer ovce obolele s praskavcem: odpadla dlaka in problemi z zadnjimi nogami (The rationale ..., 2008)

Praskavec je kljub številnim bolezenskim znakom težko diagnosticirati, saj obstaja kar nekaj drugih bolezni s podobnimi kliničnimi znaki, kot so listerioza, pljučnica in steklina (Scrapie, 2008). Na živih živalih lahko praskavec diagnosticirajo le s pomočjo biopsije limfoidnih tkiv v notranjosti tretje veke (O'Rourke in sod., 2000). Na truplih je diagnoza lažja, saj naredijo mikroskopsko preiskavo možganskih tkiv, kjer dokazujejo prisotnost patogene oblike priona (Spraker in sod., 2006).

Praskavec je prenosljiva bolezen in se prenaša na več načinov (Detwiler in Baylis, 2003):

- horizontalno: prenos med vrstniki v tropu, ponavadi s kontaktom,
- vertikalno: prenos od starša na potomce v času oplodnje, embrionalnega razvoja zarodka in poporodnega obdobja.

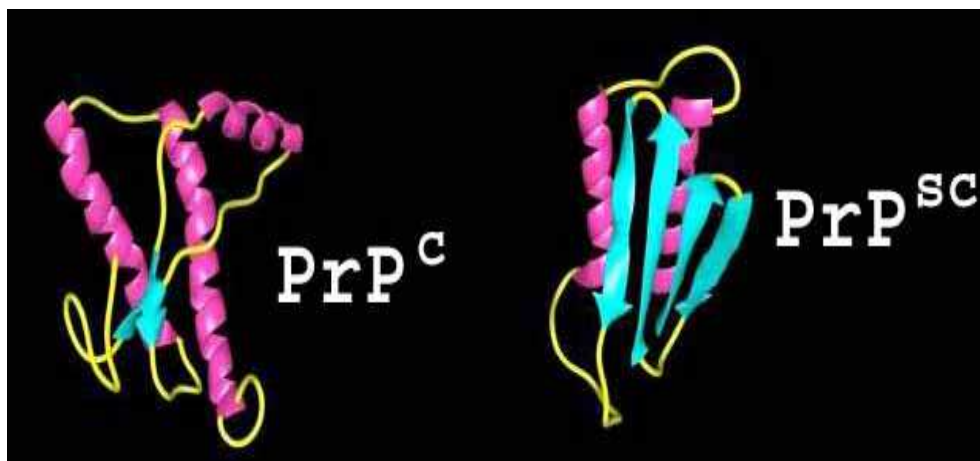
Za najpomembnejši prenos velja horizontalni prenos okužbe. Gre za prenos z živali na žival v tropu z direktnim ali indirektnim kontaktom. Najpogostejši horizontalni prenos je preko oralnih poti, obstajajo še prenosi z odpadlimi epitelnimi celicami, ki nastanejo ob praskanju živali in tudi preko limfoidnih tkiv. Ta oblika prenosa velja za zelo pogostega predvsem v močno okuženih tropih (Woolhouse in sod., 1998).

Pri vertikalnem prenosu se ponavadi okužba prenaša na potomca šele ob porodu. Vir okužbe predstavlja posteljica, ki je lahko tudi vir horizontalnega prenosa za druge živali v tropu ob morebitnem stiku (Hoinville, 1996). Vertikalen prenos je mogoč tudi preko drugih izločkov; tako Jung (1996) poroča o prenosu preko okuženega mleka in urina. Največja nevarnost vnosa praskavca v trop predstavlja prihod novih živali v trop. Tako je v Veliki Britaniji na splošno sprejeto, da je praskavec najbolj prisoten pri t.i. »razstavnih« živalih. Torej pri živalih, ki se prodajajo na avkcijah in podobnih prireditvah, pri tem pa ima pozni nastop bolezni seveda bistveno vlogo. Zato je predvsem za rejce pomembno, da namenijo pozornost predvsem živalim ob nakupu, še posebej pa pri uvozu živali iz bolj ogroženih območij, kjer je praskavec bolj pogost pojav (Gorjanc in Kompan, 2005).

### 2.3 PRIONI

Prionske bolezni prizadenejo osrednji živčni sistem. Prioni so beljakovinski kužni delci (brez nukleinske kisline), ki jih je prvi opisal Prusiner (1982). Poznamo dve obliki prionov, normalna oblika (PrP<sup>c</sup>) in abnormalna oblika (PrP<sup>sc</sup>) (Slika 2). Collinge in sod. (1994)

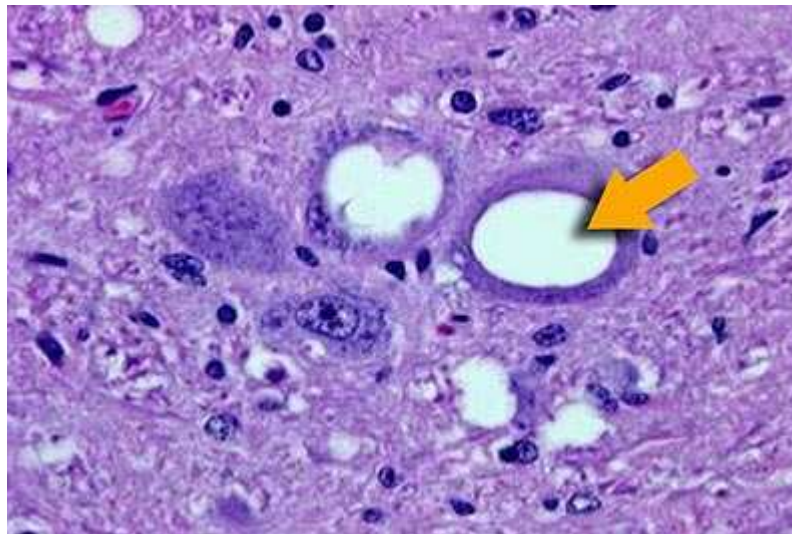
trdijo, da je normalna oblika priona ( $\text{PrP}^c$ ) vedno prisotna v celicah. Najpogosteje se nahaja na površini nevronov na katere se pritrjuje preko glikoinozitol fosfolipidnega sidra in je proteazno občutljiva. Imela naj bi sinaptične funkcije. O abnormalni obliki priona, ki povzroča prionske bolezni je prvi poročal Prusiner leta 1982.  $\text{PrP}^{sc}$  je relativno odporna na proteaze in se kopiči v citoplazemskih veziklih.



Slika 2: Tridimenzionalna slika priona, levo normalen prion, desno patogen prion (Prion Protein PrP, 2008)

Abnormalna oblika priona ( $\text{PrP}^{sc}$ ) povzroča prionske bolezni tako, da spreminja normalno obliko priona ( $\text{PrP}^c$ ) v patogeno ( $\text{PrP}^{sc}$ ), ta proces sta podrobno opisala Horwich in Weissman (1997). Ko okužena celica odmre, povzroči luknje v možganih, njeni prioni se sprostijo in tako napadejo druge celice. Abnormalna oblika priona se začne kopičiti v osrednjem živčevju in ga uničuje. Prionske bolezni se odražajo kot kopičenje patogenih prionov v centralnem živčnem sistemu, predvsem v možganih in hrbtenjači. V tkivih možganov nastanejo številne drobne vakuole, ki se pojavljajo na točno določenih mestih. Te vakuole dajejo možganskemu tkivu gobast videz (Slika 3), zaradi česar je skupina teh obolenj dobila ime spongiformne encefalopatije. Tako pri bolni živali nastane v možganih spužvasto tkivo (spongiformna degeneracija), beseda encefalopatija pa pomeni, da gre za bolezen možganov (Juntas, 2004).





Slika 3: Kopičenje spremenjenih prionov (PrP<sup>Sc</sup>) v možganih (Prion Lab, 2008)

Kopičenje patogene oblike priona velja za značilen pojav pri prionskih boleznih, zato so nekateri znanstveniki primerjali sestavo normalnega priona s patogeno obliko. Tako do sedaj med obema oblikama še ni bila odkrita nobena kemijska razlika, kar trdita Stahl in Prusiner (1991). Obe obliki pa se razlikujeta v 3D strukturi o čemer poročajo Pan in sod. (1993). Pana in sodelavce so zanimale histološke spremembe, kot posledica spremenjene beljakovine. Ugotovili so, da se na nivoju strukture proteina pri spremembi iz normalne v patogeno obliko povečuje delež  $\beta$ -listov na račun zmanjševanja  $\alpha$ -heliksov. Thomsons (2001) so zanimale še nadaljne spremembe. Odkril je, da se pozneje začnejo pojavljati histološke spremembe na centralnem živčevju (mikroskopske poškodbe v srednjih možganih, v možganskem deblu, malih možganih, različne poškodbe v progastem telesu in hrbtenjači). Značilne mikroskopske poškodbe so degeneracija nevronov, astrocitoza in spongioza. Tip degeneracije nevronov je različen, večinoma gre za skrčenje, s povečano bazofilijo (povečano število bazofilcev v tkivu) in citoplazemsko vakuolizacijo. Pojavi se tudi centralna kromatoliza in ishemične spremembe celic. Možen je tudi pojav astrocitoze. V času infekcije se najprej v astroglialnih celicah akumulira nenormalen prionski amiloidni protein. Thomsons (2001) je menil, da bi ta astroglialna celica lahko bila primarno mesto pomnoževanja proteina. Zaradi naštetih poškodb na centralnem živčnem sistemu se prionske bolezni navzven kažejo kot spremembe vedenjskega stanja. Živali ob pojavu te bolezni močno spremenijo svoje obnašanje, npr. za krave obolele za BSE je značilno, da postanejo plašne ali agresivne, nenormalno se vedejo, brcajo in škrtajo z zobmi, izgubljajo

koordinacijo gibanja in ravnotežja in postanejo preobčutljiva na dražljaje iz okolja ter tudi izgubijo apetit. Podobno pa je tudi pri ovcah.

## 2.4 PrP GEN

Dejstvo, da ta bolezen ovc velja za enega izmed možnih virov izbruha goveje spongiformne encefalopatije, ki je posredno nevarna tudi za ljudi, je znanstvenike silila v temeljito raziskovanje praskavca. Znanstveniki so se zavedali, da nekatere živali v tropu poginejo zaradi praskavca druge pa ne, ali pa poginejo pri višjih starostih. Iz tega so sklepali, da obstajajo razlike med živalmi glede odpornosti na praskavec. Prve genetske raziskave so opravili v Veliki Britaniji (Dickinson, 1976). Čredo ovac so namenoma okužili s praskavcem in jo nato selekcionirali v dve liniji na osnovi različnih inkubacijskih časov. Našli so gen, ki bi naj kontroliral inkubacijsko dobo in ga poimenovali Sip (ang. scrapie incubation period). Gen Sip bi naj imel dva alela, in sicer sA in pA. Alel sA so imele živali s krajšo inkubacijsko dobo, pA pa živali z daljšo inkubacijsko dobo (Dickinson in Outram, 1988).

Poskusi na hrčkih so pripeljali do odkritja prionov (PrP) (Prusiner, 1982). Gre za konformacijsko spremenjene beljakovine, za katere se zapis nahaja v prionskem genu (PrP), kar opisuje Oesch in sod. (1985). Domnevali so, da so nekatere oblike tega gena odgovorne za obolenje s praskavcem. Moore in sod. (1998) so s poskusi na miših prišli do zaključka, da sta gena Sip in PrP spravzaprav en in isti gen in da je polimorfizem gena PrP odločujoč za učinkovito nastajanje patogene oblike priona. Pri nekaterih živalih se je praskavec pojavil prej kot pri drugih, pri nekaterih pa se sploh ni pojavil za kar bi naj bile odgovorne različne pojavne oblike gena PrP. Nadaljne raziskave gena PrP so znanstvenike pripeljale do mest na genu (kodonov), kjer se pojavljajo razlike. Razlike se pojavljajo na kodonih 136, 154 in 171. Na kodonu 136 se lahko kodirata dve aminokislini alanin (A) in valin (V), na kodonu številka 154 arginin (R) in histidin (H) in na 171 kodonu (171) arginin (R), histidin (H) in glutamin (Q). Ta mesta so zelo blizu in jih zato obravnavamo kar kot en alel, ker je malo verjetnosti za rekombinacije med kodoni, ki so tako blizu skupaj (Preglednica 2) (Hunter, 2007). Poznanih je več alelov, med njimi so pogostejši: ARR, AHQ, ARH, ARQ in VRQ, v zadnjih nekaj letih pa je bilo odkritih še nekaj alelov pri posameznih pasmah po svetu. Tako Alvarez in sod. (2006) poroča o leucinu na kodonu 154

in alelu ALQ pri eni izmed španskih pasem, Kutzler in sod. (2002) pa poročajo o alelih AHR in VRR, ki so ju leta 2002 identificirali pri pasmah Texel, Suffolk in Nolana. Alel ARQ velja za izvoren alel, saj se vsi ostali razlikujejo od njega le na enem mestu. Ta alel je tudi najbolj pogost pri večini pasem, še posebej pri nekaterih starejših pasmah. (Gorjanc in Kompan, 2005).

Preglednica 2: Polimorfizmi na genu PrP in 5 najpogostejših alelov pri ovcah (Hunter, 2007)

Kodon	Aminokislina	Alel
136	Valin (V)	<b>VRQ</b>
	Alanin(A)	<b>ARQ</b>
		<b>ARR</b>
		<b>AHQ</b>
		<b>ARH</b>
154	Arginin(R)	<b>VRQ</b>
		<b>ARQ</b>
		<b>ARR</b>
		<b>ARH</b>
	Histidin(H)	<b>AHQ</b>
171	Glutamin(Q)	<b>VRQ</b>
		<b>ARQ</b>
		<b>AHQ</b>
	Arginin(R)	<b>ARR</b>
	Histidin(H)	<b>ARH</b>

Aminokislino povežemo z dovzetnostjo na praskavec. Tako velja Valin (V) na kodonu 136 za dovzeto aminokislino, medtem ko alanin (A) za odporno, o čemer poroča Hunter in sod. (1994). Na kodonu 154 velja histidin (H) za dovzeto aminokislino, arginin (R) pa za odporno (Laplanche in sod., 1993). Na kodonu 171 aminokislini glutamin (Q) in histidin (H) povežemo z dovzetnostjo, arginin(R) pa z odpornostjo na praskavec (Westaway in sod., 1994).

Aleli se tako med sabo razlikujejo po dovzetnosti na praskavec. Vrstni red od najbolj odpornega alela do najbolj dovzetnega je: ARR, AHQ, ARH, ARQ in VRQ. Ker so ovce diploidne živali, imajo avtosomalne kromosome in gene na njih v homolognih parih. Zato dobijo potomci en gen od očeta in enega od matere. Tako nastanejo iz teh alelov različno dovzetne kombinacije genotipov, ki jih nosijo posamezne živali (Preglednica 3). V primeru kombinacije alelov ARR in VRQ (genotip ARR/VRQ) je že bilo odkritih nekaj primerov praskavca, kar dokazuje na dominanten vpliv alela VRQ nad ARR. Na splošno pa velja, da

ovce z bolj dovzetnimi genotipi zbolijo in umirajo prej kot tiste z manj dovzetnimi. Aleli, ki so bili odkriti šele pred kratkim (ALQ, VRR in AHR) veljajo zaenkrat še za zelo redke in jih zato ne obravnavajo posebej.

Preglednica 3: Dovzetost/Odpornost ovc na praskavec glede na genotipe PrP (Hunter, 2007)

Genotip	Tveganje za okužbo s praskavcem
ARR/ARR	Najbolj odporen na praskavec
ARR/ARQ	Odporen na praskavec, vendar so lahko potomci dovzetni zaradi odvisnosti od genotipa drugega starša
ARR/ARH	
ARR/ARQ	
AHQ/AHQ	
ARH/ARH	Višja nevarnost za okužbo s praskavcem živali in njihove potomce
ARQ/ARH	
AHQ/ARH	
ARQ/AHQ	
ARQ/ARQ	Dovzetnost na praskavec, vendar bi živali lahko bile uporabljene kot vir alela ARR
ARR/VRQ	
ARQ/VRQ	
ARH/VRQ	
AHQ/VRQ	Ovce z visoko dovzetnostjo zase in potomce
VRQ/VRQ	

## 2.5 ZATIRANJE PRASKAVCA

V tropih, kjer se pojavi praskavec, povzroči veliko gospodarsko škodo. Tako si znanstveniki in seveda tudi rejci želijo kontrole nad to boleznijo. O pomembnosti kontrole nad praskavcem se je začelo govoriti v začetku 90. let prejšnjega stoletja, in sicer iz dveh razlogov. En razlog je odkritje nove oblike Creutzfeldt-Jacobove bolezni, drug razlog pa je možen preskok BSE-ja na ovce, kar so na poskusih dokazali Foster in sod. (1993). Skrb vzbujajoče je dejstvo, da je BSE za razliko od praskavca, posredno nevarna za ljudi, ter da je ločevanje BSE-ja od praskavca skorajda nemogoče. Tako obstaja možnost, da bi praskavec prikrižal možen izbruh BSE-ja pri ovcah (Juntas in sod., 2005). Zaradi teh dejstev si znanstveniki in javnosti želijo zatreti vsaj eno izmed obeh prionskih bolezni.

Države so se zatiranja praskavca lotile na različne načine (Detwiler in Baylis, 2003):

- popolno uničenje okuženega tropa in sorodnih tropov od koder živali iz okuženega tropa izvirajo,
- uničenje okuženih živali in njihovih sorodnikov, predvsem po maternalni strani,

- uničenje živali, katere predstavljajo tveganje za izbruh praskavca v tropu, npr. uničenje vseh mladičev,
- uničenje okuženih živali,
- čiščenje in dezinfekcija vseh prostorov, kjer so se nahajale okužene živali,
- upoštevanje določene dobe, ki mora preteči med uničenjem okuženega tropa in vhlevitvijo novega tropa v prostore,
- uporaba selekcije za zatiranje praskavca na osnovi genotipa PrP.

O samem zatiranju praskavca so govorili že v 18. stoletju (Leopoldt, 1759, cit. po Detwiler in Baylis, 2003). Tako je Leopoldt (1759) že leta 1759 pisal o tem, da naj rejci žival obolelo za praskavcem čimprej izločijo ali pa vsaj izolirajo od ostalega tropa. Skozi leta so države ubrale mnogo različnih pristopov k zatiranju praskavca. V državah kot sta Avstralija in Nova Zelandija je bil pristop pravilen in učinkovit, v nekaterih drugih državah (Kanada, Islandija in ZDA) pa je bila strategija zatiranja manj uspešna (Detwiler in Baylis, 2003). Ključno v primerih Avstralije in Nove Zelandije je bilo, da so praskavec odkrili še dovolj zgodaj in so s takošnjim uničenjem obolelih živali in njihovih sorodnikov preprečili okužbo ostalih tropov v državi. V nekaterih državah (npr. Islandija), kjer je bilo zatiranje manj uspešno, je praskavec skozi leta postal endemična bolezen in tako se sedaj vedno pojavlja v istih tropih na istih območjih (Thorgeirsdottir in sod., 1999).

Močna povezava med okužbo s praskavcem in genotipom PrP, daje selekciji na genotip PrP veliko prednost proti ostalimi strategijami. Ta strategija selekcije daje upanje na možno kontrolo te bolezni (Schreuder in sod., 1997). Tako so začeli izvajati program selekcije na genotip PrP v mnogih državah (Velika Britanija, Francija, Nizozemska, ...). Velika Britanija je leta 2001 v sklopu selekcije na genotip PrP uvedla t.i. National Scrapie Plan (NSP), v katerem so posamezne genotipe PrP razdelili v več skupin, glede na odpornost (Dawson in sod., 2008). Skupine so poimenovali kar skupine NSP (National Scrapie Plan) ter genotipe razvrstili v pet skupin, od najbolj odpornih do najbolj dovzetnih. Najbolj odporen genotip ARR/ARR je uvrščen v skupino ena, genotip VRQ/VRQ, ki velja za najbolj dovzetnega pa v skupino pet. V drugo skupino uvrščamo genotipe, pri katerih je en alel ARR, drugi pa ni VRQ, v tretjo skupino pa uvrščamo vse možne genotipe ki se pojavljajo, brez alel ARR in VRQ. V četrto skupino NSP uvrščamo genotip ARR/VRQ (Preglednica 4).

Preglednica 4: Skupine NSP (Dawson in sod., 2008)

Skupina NSP	Genotip
1	ARR/ARR
2	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ
3	AHQ/AHQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, ARQ/ARQ
4	ARR/VRQ
5	AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ

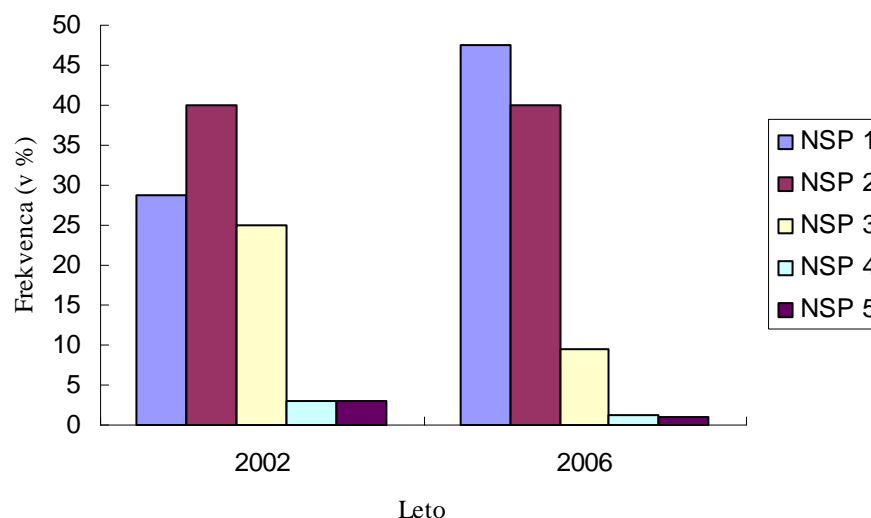
Nekatere druge države, predvsem severno evropske so sledile angleškemu modelu zatiranja praskavca. Leta 2003 se jim je zakonsko priključila še Evropska Unija. V letu 2003 je Komisija EU sprejela uredbo 2003/100/ES, ki je določala minimalne pogoje za vzpostavitev rejskih programov za odpornost na transmisivne spongiformne encefalopatije pri ovcah. Odločba zahteva, da je dolžnost vsake članice Evropske Unije, uvedba rejskega programa za izbiro odpornosti proti TSE pri nekaterih pasmah ovc (Odločba komisije ..., 2003). V letu 2006 je bila na Svetu in v Evropskem Parlamentu sprejeta sprememba oziroma dopolnitev Uredbe (ES) št. 999/2001, ki daje pravno podlago za izvajanje selekcije na TSE. Ta dopolnitev uredbe določa, da se rejski programi držav članic osredotočijo na trope z visokim genetskim potencialom, vzpostavitev podatkovne baze o rodovniku živali in morebitnih že določenih genotipih. Prav tako določa metodo genotipizacije in ustanove, ki so pooblaščen za izvajanje le te. Rejski programi se sestavijo za posamezne pasme na podlagi: frekvenc alelov znotraj pasme, staleža pasme in izogibanja parjenja v sorodstvu in/ali naključnega toka frekvenc alelov. Osnovna ideja je povišanje frekvence alela ARR v tropu ovac, hkrati pa zmanjšanje alelov, ki prispevajo k dovzetnosti na TSE, predvsem alela VRQ. Uredba tudi določa, da se iz čred, kjer je genotip plemenskih živali poznan, odbirajo le živali, pri katerih obstaja verjetnost, da je vsaj en alel ARR. Živali, pri katerih obstaja verjetnost, da imajo najmanj en alel VRQ, se ne odbira. Pri selekcijskem delu je usmeritev, da v kolikor živali ustrezajo drugim pogojem, imajo pri odbiri prednost živali z genotipom ARR/ARR ( torej živali iz NSP 1), sledijo živali z genotipom ARR/- (NSP 2). Živali iz NSP 4 in NSP 5 gredo v zakol, medtem ko se živali iz tretje skupine NSP odbirajo le v kolikor je to potrebno, torej ali zaradi pomanjkanja drugih živali ali v primeru izredno dobre kvalitete teh živali. Tako bi sčasoma skušali doseči čim večjo frekvenco alela ARR in čim manjšo frekvenco alela VRQ (Uredba št. (ES) 999/2001 ..., 2001). Na splošno je frekvenca alela VRQ že sedaj nizka, vendar pa je velikokrat nizka tudi frekvenca alela ARR (Preglednica 5). Pri večini

pasem ima najvišjo frekvenco alel ARQ, tako je najvišja tudi frekvenca genotipa ARQ/ARQ. Zato je, kot navajata tudi Gorjanc in Kompan (2005), število obolelih ovac s praskavcem z genotipom ARQ/ARQ enako ali celo večje kot pri genotipu VRQ/VRQ.

Preglednica 5: Frekvence alelov pri nekaterih evropskih pasmah (Lühken in sod., 2008)

Pasma	Frekvence posameznih alelov (v %)				
	ARR	ARQ	AHQ	ARH	VRQ
Altamura (ITA)	32,3	53,2	8,1	6,4	0
Braunes Bergschaf (NEM)	21,9	75,0	0	0	3,1
Churra (POR)	16,7	76,7	3,3	3,3	0
Hungarian Merino (HU)	32,3	59,7	4,8	1,6	1,6
Karakul (ROM)	12,9	87,1	0	0	0
Latacauda (ITA)	51,6	37,1	3,2	8,1	0
Rhoenschaf (NEM)	45,1	38,7	0	8,1	8,1
Swaledale (UK)	50,0	22,6	24,2	0	3,2

Dawson in sod. (2008) trdijo, da nas takšen enostaven genetski nadzor nad praskavcem vodi do priložnosti, da dobimo pasme, ki so bolj odporne na to bolezen. V svoji študiji opisuje uspehe selekcije na genotip PrP, ki so bile dosežene s programom NSP v Veliki Britaniji. Tako je bilo do sedaj genotipiziranih že več kot 700 000 ovnov iz 90 različnih pasem po vsem svetu. Dawson je primerjal spremembo frekvenc posameznih skupin NSP v Veliki Britaniji od začetka uvedbe NSP programa (2001) pa do leta 2006 (slika 3). Frekvenca genotipov uvrščenih v skupino NSP 1 se je povišala z 28,8% na 47,6%. Frekvenca genotipov iz skupine NSP 2 je ostala na isti ravni, in sicer 40%. Število živali z genotipi iz skupine NSP 3 se je znižalo iz 24,9% na 9,4%. Prav tako pa je opazen padec frekvence genotipov iz NSP 4 in NSP 5, in sicer od 5,9% na 2,3% (slika 4).



Slika 4: Sprememba frekvenca (v %) skupin NSP (National Scrapie Plan) od začetka uvedbe programa selekcije (2002) in letom 2006 (Dawson in sod., 2008)

Selekcija na genotip PrP sloni na negativni odbiri živali z VRQ alelom in spodbuja odbiro živali z ARR alelom. Po uvedbi programa selekcije na genotip PrP se je frekvenca alela ARR v tropih po Veliki Britaniji povečala za 36,5%, frekvenca ostalih alelov pa so se zmanjšale. Frekvenca alela VRQ se je zmanjšala za kar za 60% (Preglednica 6).

Preglednica 5: Spremembe v frekvencah alelov po uvedbi programa selekcije na genotip PrP v tropih po Veliki Britaniji (Dawson in sod., 2008)

Alel	Frekvenca v letu 2002 (v %)	Frekvenca v letu 2006 (v %)	Sprememba frekvenca (v %)
ARR	50,4	68,8	+36,5
AHQ	7,4	5,5	-25,7
ARH	9,9	5,6	-43,4
ARQ	29,2	18,9	-35,3
VRQ	3,0	1,2	-60,0

Pojavlja pa se tudi nekaj dvomov o pravilnosti selekcije na genotip PrP. Znanstvenike skrbijo posledice zmanjšane ali celo obratne selekcije na proizvodne lastnosti, možni so vplivi parjenja v sorodstvu, možen je pojav manjše genetske variabilnosti, neznan pa ostaja tudi vpliv alelov na številne druge lastnosti. Tako so izšle številne študije o vplivih selekcije na proizvodne lastnosti, ki so po večini zavračale te skrbi. Tako Prokopova in sod. (2002) niso našli nobene trdne povezave med rastnostjo in genotipom PrP. V Nemčiji



so analizirali vpliv genotipa PrP na proizvodne lastnosti tako pri mesnih (De Vries in sod., 2004) kot pri mlečnih pasmah (De Vries in sod., 2005). Pri nobeni od obeh študij niso prišli do trdnih dokazov o vplivu genotipa PrP na proizvodne lastnosti. Nekaj povezav pa se je le našlo. Brandsma in sod. (2004) so pri pasmi Texel ugotovili, da sta alela ARR in VRQ povezana z višjo rojstno težo, alel VRQ pa tudi z višjo težo ob 135 dnevu starosti. Sawalha in sod. (2007) poročajo o večji preživetveni sposobnosti jagnjet z dovetnejšimi aleli, predvsem alela ARQ, kar Sawalha in sod. opisujejo kot enega izmed vzrokov visoke frekvence alela ARQ v tropih. Sweney in Hanrahan (2008) sta zbrala celotno literaturo, ki govori o vplivu genotipa PrP na proizvodne, reproduktivne lastnosti in zdravje živali. Sklepala sta, da do sedaj ni nobenih trdnih dokazov, da selekcija na genotip PrP vpliva na proizvodne, reproduktivne lastnosti ali zdravstveno stanje živali. Alfonso in sod. (2006) so proučevali kako selekcija na genotip PrP vpliva na koeficient inbridinga. V študiji niso našli omembe vrednega povečanja koeficienta inbridinga v proučevanih tropih. Do podobnega zaključka so prišli tudi Palhière in sod. (2006) v svoji študiji selekcije na genotip PrP pri francoskih pasmah ovac. Na povišanje parjenja v sorodstvu selekcija na genotip PrP ne bi smela bistveno vplivati, razen pri pasmah, ki so manjštevilične (Dawson in sod., 2008). Problem takšne selekcije je tudi, da ni popolnoma jasno, kakšen je mehanizem odpornosti na okužbo. Znanstveniki niso prepričani ali gre pri določenih alelih le za podaljšanje inkubacijske dobe ali dejansko odpornost. Moore in sod. (1998) so na podlagi poskusov na miših menili, da gre bolj za podaljšanje inkubacijske dobe. Dvom glede pravilnosti selekcije nastaja tudi zaradi odkritij določenih variacij izven omenjenih treh mest na genu PrP. Moum in sod. (2005) poročajo o variabilnosti povezani z PrP genotipom na kodonu 141. Baylis in Goldman (2004) pa poročata o nekonstantnem vplivu gena PrP na odpornost proti praskavcu pri različnih pasmah in tudi o možnosti različnih vrst praskavca, pri katerih povezava PrP gena z odpornostjo ni jasna. Nekateri se sprašujejo ali so nekateri aleli in genotipi res bolj ali manj odporni za praskavec in je tako pozitivna oziroma negativna selekcija proti ali v njihovo korist res upravičena. Tako na eni strani poroča Hunter (2007) o tropih v območjih Velike Britanije, kjer se pri živalih genotipa VRQ/VRQ skoraj zagotovo razvije praskavec, po drugi strani pa Bossers in sod. (1999) poročajo v Novi Zelandiji in Avstraliji ter Tranulis in sod. (1999) na Norveškem o živalih z genotipom VRQ/VRQ, ki so klinično zdrave. O še eni drugi

skrajnosti pa poroča Ikeda in sod. (1995) in sicer o pojavu praskavca pri ovci z genotipom ARR/ARR na Japonskem.

Leta 2003 so odkrili tudi nov sev oziroma tip praskavca z nenavadnimi značilnostmi in ga poimenovali Nor98 ali tudi atipični praskavec (Benestad in sod., 2003). Moum in sod. (2005) so odkrili, da je ta oblika praskavca povezana z polimorfizmom na kodonu 141 in 154 in da nobena izmed teh obolelih živalih ni imela alela VRQ. V zadnjem času so izšla številna poročila, ki govorijo o primerih atipičnega praskavca, tako Bosschere in sod., (2004) poročajo o tej obliki praskavca v Belgiji, Buschmann in sod. (2004) poročajo o atipičnem praskavcu v Nemčiji, Gavier-Widen in sod. (2004) pa na Švedskem, kar daje sum, da se ta oblika praskavca pojavlja v večini evropskih držav (Ulvund, 2008), in tako postavlja dosedanje zatiranje praskavca pred nov velik dvom.

## 2.6 SEGREGACIJSKA ANALIZA

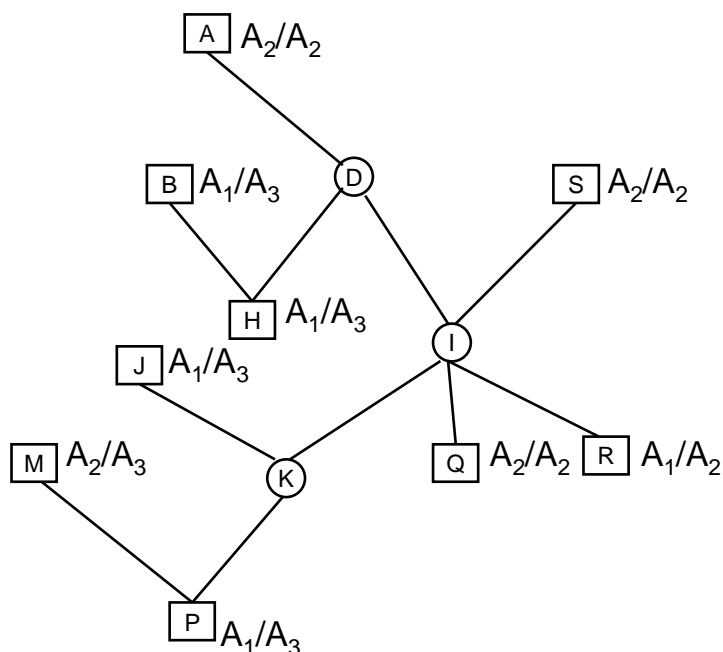
Genotipiziranje živali je postala učinkovita metoda zatiranja praskavca. Žal v večini rej vse živali niso genotipizirane. Stroški genotipizacije se sicer zmanjšujejo, vendar pa zbiranje tkiv, genotipizacija in poznejša administracija še vedno predstavljajo zajeten strošek za rejske programe. Živali, ki niso genotipizirane, zavirajo učinkovitost selekcije, zato so kakršnekoli metode, ki nam dajejo dodatne informacije o genotipu teh živalih dobrodošle (Vitezica in sod., 2005). Dejstvo je, da lahko z gotovostjo določimo genotip potomca v kolikor sta njegova starša homozigota. Na primer, če imata starša genotip ARR/ARR in ARQ/ARQ, potem imajo njuni potomci z gotovostjo genotip ARR/ARQ. Določitev genotipa za negenotipizirane živali je star, a pomemben problem. Elston in Stewart (1971) sta bila prva, ki sta predstavila splošno metodo za določitev genotipa sorodnikov. Metodo sta uporabila v humani genetiki, kjer sta poskušala določiti učinek letalnih alelov. Želela sta ugotoviti ali se letalni geni odražajo dominantno ali recesivno. Poleg tega pa sta poskušala določiti prenašalce teh letalnih genov. Celoten postopek imenujemo segregacijska analiza. Del segregacijske analize predstavlja izračun verjetnosti genotipa za negenotipizirane osebkke na podlagi znanega genotipa sorodnikov. Verjetnost genotipov posameznega osebka sta izračunala tako, da sta preračunala verjetnosti genotipov od vrha rodovnika navzdol in z dna rodovnika navzgor. Metodo imenujemo luščenje (ang. peeling).

V živinoreji so rodovniki bolj prepleteni kot pri ljudeh, zato Elstonov in Stewartov algoritem ni primeren za uporabo (van Arendonk in Kennedy, 1989). Rodovniki v živinoreji so večji, samci imajo veliko več potomcev, samice v življenjskem obdobju zamenjajo več partnerjev, pogost pojav pa je tudi parjenje v sorodstvu. Van Arendonk in Kennedy (1989) sta bila prva, ki sta Elstonov in Stewartov algoritem priredila za uporabo v živinoreji. Van Arendonkova metoda je poznana tudi pod imenom iterativno luščenje. Pri iterativnem luščenju je verjetnost, da ima posameznik določen genotip determinirana kot funkcija verjetnosti genotipov ancestralnih (starši, stari starši, potomci, ...) in kolateralnih (bratje, sestre, ...) sorodnikov (Van Arendonk in Kennedy, 1989). Pri izračunu verjetnosti genotipa posameznika upoštevamo tako podatke prek vseh sorodstvenih vezi. Pozneje so metodo dopolnili še nekateri drugi (Fernando in sod., 1993; Janss in sod., 1995; Kerr in Kinghorn, 1996). Razvite so bile tudi nekatere druge metode za izračun verjetnosti genotipov (Fernandez in sod., 2001; Henshall in Tier, 2003; Gengler in sod., 2007). Thallman in sod. (2001a, b) so razvili metodo alelnega luščenja, ki je v bistvu razširjena oblika Van Arendonkovega iterativnega luščenja. Za razliko od Van Arendonkove metode alelno luščenje spremlja tok alelov v rodovniku. Prednost je v tem, da omogoča delo z več kot dvema aleloma. V naslednjem poglavju bomo predstavili delovanje metode alelnega luščenja.

### **3 PRIKAZ ALELNEGA LUŠČENJA**

Thallmanovo alelno luščenje izračunava verjetnosti genotipov v več korakih. Pri teh korakih poišče t.i. končne starše in končne potomce. Končni starši so tisti osebkim ki nimajo znanih prednikov. Končni potomci so na drugi strani tisti osebki, ki nimajo znanih potomcev. Algoritem najprej izkoristi vse informacije, ki jih ima na voljo od končnih staršev ter jih prenese na njihove potomce, s tem »odlušči« končne starše iz rodovnika. V naslednjih korakih teh končnih staršev ni več v rodovniku. V naslednjem koraku se usmeri h končnim potomcem, kjer informacije prenese na njihove starše, in s tem »odlušči« končne potomce. Tudi končnih potomcev v naslednjih korakih ne upoštevamo več. Tako algoritem lušči rodovnik vse do analiziranega osebka. Formulacija omenjene metode je predstavljena v Thallman in sod. (2001a, b). Mi bomo delovanje algoritma prikazali na

intuitiven način, pri čemer bomo uporabili enostavno rodovnik brez zank na sliki 5 (Thallman in sod., 2001a).



Slika 5: Primer rodovnika za prikaz delovanja algoritma (Thallman in sod., 2001a)

V rodovniku je 12 osebkov. Na lokusu, ki ga opazujemo se pojavljajo tri različne oblike gena - tri alele:  $A_1$ ,  $A_2$  in  $A_3$ . Devet osebkov ima znan genotip, trije pa ne (D, I in K). Kvadrat predstavlja osebek ženskega spola, krog pa osebek moškega spola, tako da imamo v tem rodovniku devet žensk in tri moške. Želimo izračunati verjetnost možnih genotipov za osebek I.

### 3.1 ENOSTAVNI SKLEPI

Pred prikazom delovanja Thallmanovega algoritma bomo prikazali, da je že na tako relativno enostavnem primeru zamudno in težko določiti verjetnost genotipov. V nadaljevanju bomo nanizali enostavne sklepe, ki jih lahko naredimo glede na zbrane podatke.

1. Mati osebk D je A in ima znan genotip ( $A_2/A_2$ ). Ker je mati homozigot, smo popolnoma prepričani, da bo na sina prenesla alel  $A_2$ . Tako je genotip njenega sina (osebek D)  $A_2/*$ , kjer je \* lahko  $A_1$ ,  $A_2$  ali  $A_3$ , saj ne poznamo očeta.
2. Glede na to, da je hči osebk D po genotipu  $A_1/A_3$  in da je njena mati tudi po genotipu  $A_1/A_3$ , lahko sklepamo, da je osebek D prenesel hčeri alel  $A_1$  ali  $A_3$ . Tako so verjetnosti genotipa za osebek D sledeče:  $\Pr(A_1/A_2) = 0,5$  ;  $\Pr(A_2/A_3) = 0,5$ .
3. Mati osebk P je M in ima znan genotip ( $A_2/A_3$ ). Prav tako ima znan genotip osebek P ( $A_1/A_3$ ). Tako lahko z gotovostjo trdimo, da je mati osebk P (osebek M) prenesla alel  $A_3$  na svojo hčerko P.
4. Ker je osebek P dobil alel  $A_3$  od svoje mame, lahko z gotovostjo trdimo, da je alel  $A_1$  dobil od svojega očeta K.
5. Osebek K je imel neznan genotip, vendar zaradi sklepa 4. lahko z gotovostjo trdimo, da je alel  $A_1$  prenesel na svojo hčerko P. Od mame je osebek K lahko dobil alel  $A_1$  ali  $A_3$ ; oče pa ni imel znanega genotipa. Glede na dosedanje sklepe je lahko genotip osebk K enak  $A_1/A_1$ ,  $A_1/A_2$  (kasneje bomo pokazali, da oče I sigurno nosi alel  $A_2$ ) ali  $A_1/A_3$ . Verjetnosti genotipov niso enake, ker so nekateri genotipi (npr.  $A_1/A_2$ ) bolj verjetni.
6. Mati osebk I je homozigot ( $A_2/A_2$ ). Iz tega lahko z gotovostjo trdimo, da je na svojega sina I prenesla alel  $A_2$ .
7. Osebek Q je hčerka osebk I in je homozigot ( $A_2/A_2$ ). Njena sestra R pa je heterozigot ( $A_1/A_2$ ). Brat K ima neznan genotip. Iz sklepa 5. vemo, da nosi vsaj en alel  $A_1$ . Genotip očeta (D) je neznan. Na podlagi sklepa 2. in genotipa potomcev, lahko sklepamo, da je genotip osebk I enak  $A_2/*$ , kjer verjetnosti, da osebek I nosi posamezen alel niso enake.

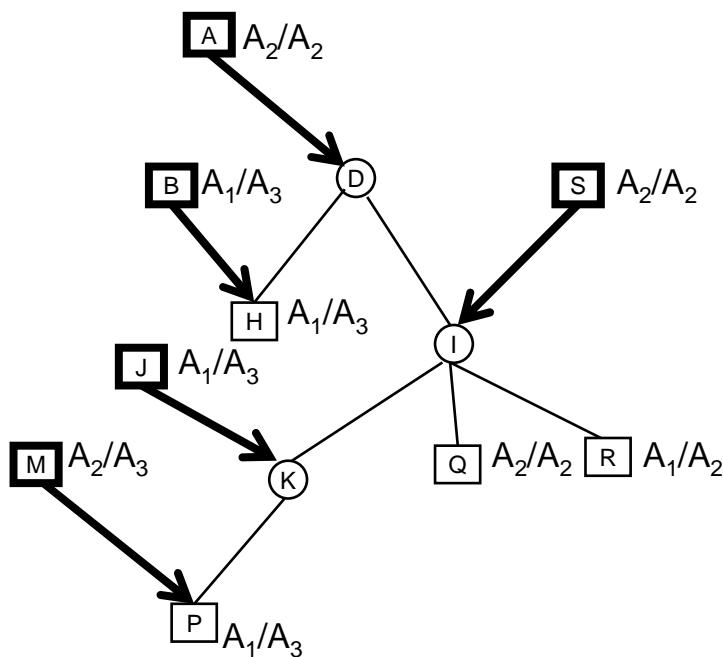
V tem poglavju smo prikazali sklepe, ki jih lahko ugotovimo z enostavnimi sklepi. Takšno sklepanje je že na tako enostavnem primeru težko in zamudno delo, kar pomeni, da so kompleksnejši rodovniki (živinorejski rodovniki) še zahtevnejši. Kljub znanemu rodovniku in genotipih sorodnikov, že na tako enostavnem rodovniku nismo mogli določiti verjetnosti

posameznih genotipov na osebkih z neznanim genotipom. Vedeli smo le, da so verjetnosti posameznih genotipov za nek osebek niso enake, nismo pa mogli določiti točnih vrednosti, tudi zaradi tega je uporaba algoritma alelnega luščenja potrebna.

## 3.2 PRIKAZ DELOVANJA ALELNEGA LUŠČENJA

### 3.2.1 Prvi korak

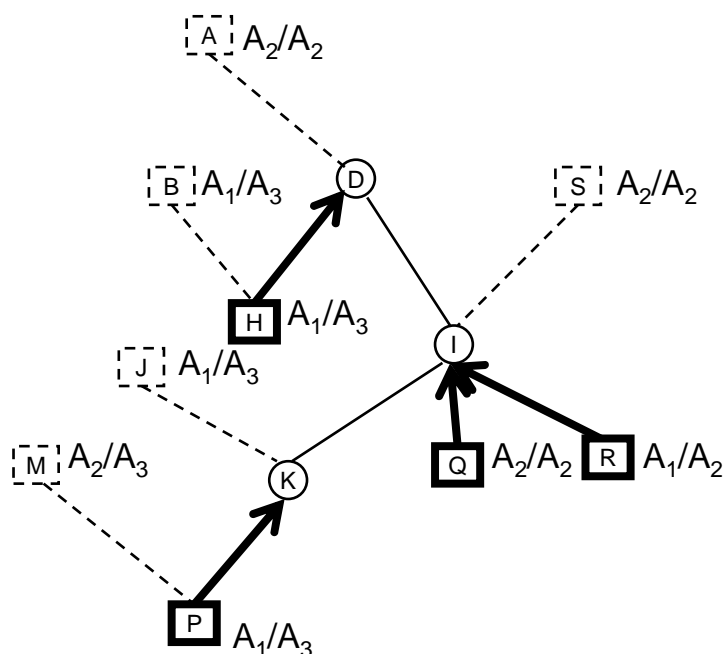
V prvem koraku algoritem poišče končne starše v rodovniku. To so tisti osebki, ki nimajo znanih prednikov. Končni starši iz rodovnika so: A, B, J, M in S (slika 6). Tako v prvem koraku algoritem prenese informacije s končnih staršev na njihove potomce. Podobno smo storili tudi mi v posameznih sklepih v točki 2.3.1.



Slika 6: Prvi korak luščenja rodovnika - končni starši, prvič

### 3.2.2 Drugi korak

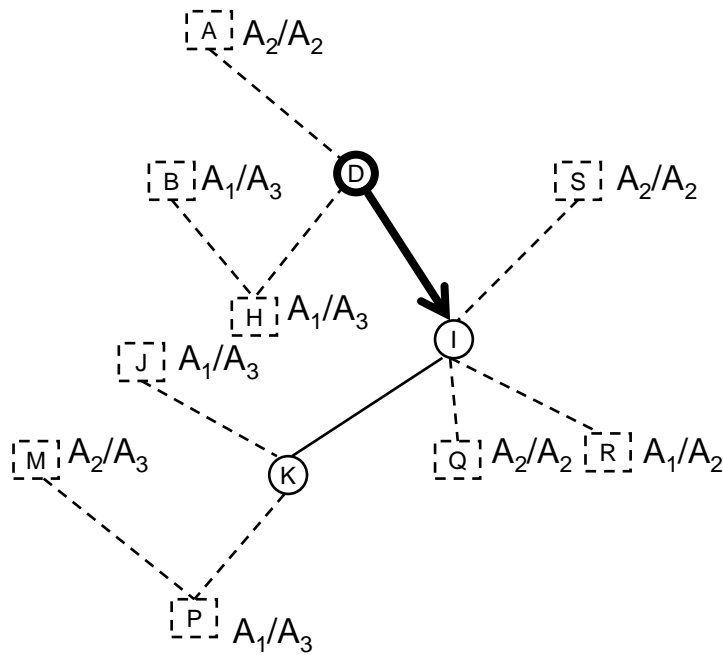
V drugem koraku algoritem poišče končne potomce v rodovniku. To so tisti osebki, ki nimajo nobenih potomcev glede na že »odluščen« rodovnik. V našem primeru so končni potomci: H, P, Q in R (slika 7). Algoritem v tem koraku prenese informacije od potomcev na njihove starše. Pri tem je potrebno opozoriti, da ta informacija vsebuje informacijo potomcev in tudi informacije prenesene od njihovih staršev (glej prvi korak).



Slika 7: Drugi korak luščenja rodovnika - končni potomci, prvič

### 3.2.3 Tretji korak

V tretjem koraku algoritem ponovno poišče končne starše. V našem primeru gre za osebek D (slika 8). Algoritem v tem koraku spet prenese informacije od končnih staršev na njihove potomce. Pri tem pa upošteva informacije, ki jih je pridobil v prejšnjih korakih (glej prvi in drugi korak).

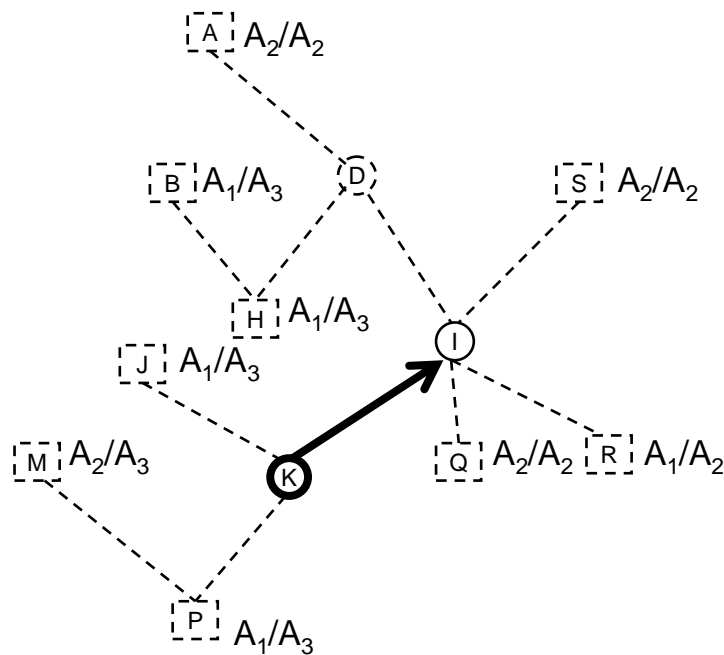


Slika 8: Tretji korak luščenja rodovnika - končni starši, drugič



### 3.2.4 Četrty korak

V četrtem koraku algoritem ponovno poišče končne potomce. Sedaj gre za osebek K, od koder prenesemo informacije na osebek I (slika 9). Potrebno je poudariti, da ob tem prenosu informacije od osebka K na osebek I, algoritem upošteva vse predhodno zbrane informacije (glej prvi, drugi in tretji korak).



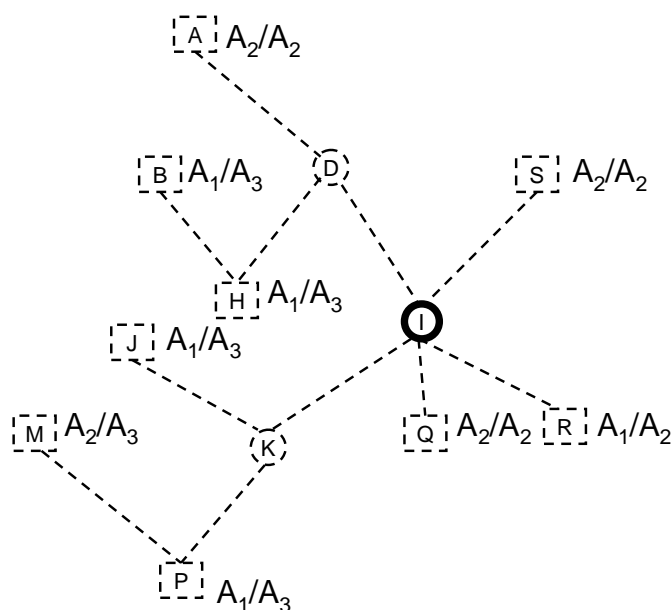
Slika 9: Četrty korak luščenja rodovnika - končni potomci, drugič

### 3.2.5 Peti korak

V petem koraku algoritem zbere vse predhodno pridobljene informacije (glej prvi, drugi, tretji in četrty korak) in izračuna verjetnost genotipov osebk I (slika 10, preglednica 7). Iz izračuna lahko razberemo, dejstvo, ki smo ga omenjali že v točki 2.3.1 (točki 6 in 7), in sicer da je z gotovostjo en alel  $A_2$ . Drugega alela pa v točki 2.3.1 nismo mogli natančno določiti (točka 7). Iz preglednice verjetnosti posameznih genotipov lahko razberemo, da je algoritem alelnega luščenja izračunal, da je verjetnost genotipa  $A_1/A_2$  31%, verjetnost genotipa  $A_2/A_2$  62% in verjetnost genotipa  $A_3/A_2$  8%. O pravilnosti rezultata nas dodatno potrjuje vsota vseh treh verjetnosti, ki je enaka 1.

Preglednica 6: Verjetnost genotipov za osebek I

	A1	A2	A3
A1	0	0,3077	0
A2	0	0,6154	0
A3	0	0,0769	0



Slika 10: Peti korak luščenja rodovnika- analiziran osebek (I)

### 3.3 PRIMERJAVA SKLEPOV O RODOVNIKU IN REZULTATOV ALGORITMA

V tem poglavju bomo primerjali med sabo naše sklepe o verjetnosti posameznega genotipa (glej točko 3.1) in izračunanih verjetnosti, ki smo jih dobili s pomočjo algoritma alelnega luščenja. V rodovniku smo imeli tri osebkke z neznanim genotipom (D, K in I) za katere smo najprej poskušali ugotoviti njihov genotip, pozneje pa smo še izračunali verjetnost posameznih genotipov s pomočjo algoritma alelnega luščenja. S tem bomo poskušali na eni strani preveriti pravilnost našega sklepanja v točki 3.1, na drugi strani pa tudi prikaz delovanja algoritma alelnega luščenja.

#### OSEBEK D

V sklepih (točka 3.1) smo zapisali, da ima osebek D zagotovo en alel  $A_2$  (sklep 1), drugi alel pa je  $A_1$  ali  $A_3$ . Ker sta obe možnosti enako verjetni smo sklepali, da sta verjetnosti genotipa  $A_1/A_2$  in  $A_2/A_3$  enaki 50% (sklep 2). Preglednico verjetnosti posameznih genotipov za osebek D smo dobili s pomočjo alelnega luščenja (Preglednica 8). Ugotovimo lahko, da je šlo naše sklepanje iz točke 2 o možnih genotipih osebka D v pravo smer. Z alelnim luščenjem smo izračunali 60% verjetnost, da je osebek D genotipa  $A_2/A_1$  in 38% verjetnost, da je genotipa  $A_2/A_3$ .

Preglednica 7: Verjetnosti genotipov za osebek I

	$A_1$	$A_2$	$A_3$
$A_1$	0	0,6154	0
$A_2$	0	0	0
$A_3$	0	0,3846	0

#### OSEBEK K

V rodovniku je imel neznan genotip tudi osebek K. Za osebek K smo sklepali, da ima z gotovostjo vsaj en alel  $A_1$ , drugega pa mu ne moremo zagotovo določiti. Preglednico verjetnosti posameznih genotipov za osebek K smo dobili s pomočjo izračuna algoritma alelnega luščenja (Preglednica 9). Izračun nam potrjuje tezo o gotovosti alela  $A_1$ , ter nam natančneje daje verjetnosti za genotipe  $A_1/A_1$ ,  $A_1/A_2$  in  $A_1/A_3$ .

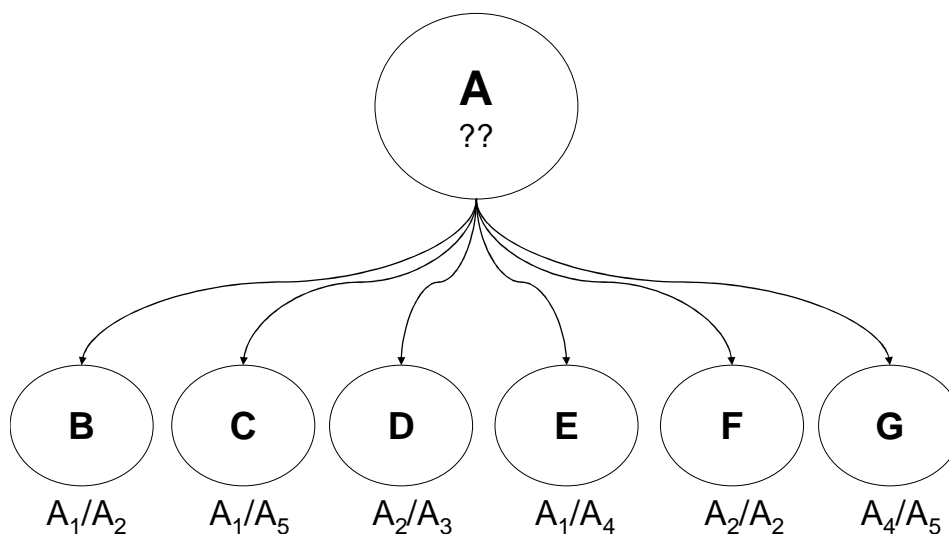
Preglednica 8: Verjetnosti genotipov za osebek I

	A1	A2	A3
A1	0	0,6154	0
A2	0	0	0
A3	0	0,3846	0

Pojavljajo se določene razlike med našimi sklepi in rezultati algoritma alelnega luščenja. Potrebno je poudariti, da smo v enostavnih sklepih delali po posameznih korakih in zato nismo imeli na voljo vseh informacij. Metoda alelnega luščenja za izračun verjetnosti genotipov za posamezen osebek uporablja vse možne korake alelnega luščenja (glej poglavje 3.2) in tako uporabi vse informacije hkrati. Glede na dejstvo, da je sklepanje o rodovniku tudi precej zamudno delo, pa ima tudi glede tega metoda alelnega luščenja precej prednosti, saj se do konkretnih izračunov dokoplje precej hitreje.

#### 3.4 MODEL NEPOPOLNE PENETRANCE

Rodovniki so v živinoreji večji, samci imajo veliko več potomcev, samice v življenjskem obdobju zamenjajo več partnerjev, pogost pojav pa je tudi parjenje v sorodstvu. Zaradi same kompleksnosti rodovnikov so možne napake v podatkih. Thallman in sod. (2001a, 2001b) napake v podatkih porekel obide z modelom nepopolne penetrance, kjer enostavno fenotipske vrednosti (gre za dejanske vrednosti) obravnava kot genotipske vrednosti. Thallman je model nepopolne penetrance uporabil pri izračunavanju verjetnosti genotipov s pomočjo alelnega luščenja. Model upošteva možnost napak v kompleksnih. Za prikaz, kakšen vpliv ima model nepopolne penetrance na izračun verjetnosti posameznih genotipov smo uporabili enostaven primer na sliki 11 (Gorjanc in Kompan, 2008). V tem primeru imamo osebek A, ki ima šest potomcev (B, C, D, E, F in G). Možnih je pet različnih alelov ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  in  $A_5$ ). Osebek A ima neznan genotip, medtem ko genotipe njegovih potomcev poznamo. Sklepamo lahko, da ima osebek A genotip  $A_1/A_2$  in sumimo na napako pri genotipu njegova potomca G ( $A_4/A_5$ ).



Slika 11: Primer rodovnika za prikaz modela nepopolne penetrance

Če v metodi alelnega luščenja uporabimo model popolne penetrance, so zbrani podatki neuporabni. Tako moramo ali popraviti napako ali enostavno osebek G izbrisati iz analize. V tem primeru je osebek G enostavno izbrisati iz rodovnika, ali mu samo izbrisati najverjetneje napačno analiziran genotip. V kompleksnih rodovnikih z veliko osebkami, pa gre za »Sizifovo delo«. Z namenom, da bi ugotovili, kakšen vpliv ima model nepopolne penetrance na izračun verjetnosti genotipov sta Gorjanc in Kompan (2008) izračunala verjetnost posameznih genotipov za osebek A z modelom popolne penetrance kot z modelom nepopolne penetrance. Za rabo modela popolne penetrance za izračun verjetnosti genotipov osebkov A smo najprej iz analize izločili osebek G. Tako smo dobili samo eno možnost genotipa za osebek A ( $A_1/A_2$ ) s 100% verjetnostjo (Preglednica 10). Za test modela nepopolne penetrance smo v enem primeru osebek G izločili iz analize v drugem pa ga pustili v rodovniku. Če smo pri uporabi modela nepopolne penetrance osebek G izključili iz analize, je bila verjetnost genotipa  $A_1/A_2$  za osebek A 87%. Ko pa smo osebek G pustili v analizi pa je ta verjetnost padla na 44% (Preglednica 9).

Preglednica 9: Izračun verjetnosti genotipov in alelov za osebek A s popolno in nepopolno penetranco

Genotip	Pop. penetranca	Nepop. penetranca <sup>1</sup>	Nepop. penetranca <sup>2</sup>
A1/A1	0	0,000883	0,00450
A1/A2	1,00	0,867400	0,44191
A1/A3	0	0,033360	0,01700
A1/A4	0	0,004760	0,03273
A1/A5	0	0,004760	0,03273
A2/A2	0	0,008830	0,00450
A2/A3	0	0,004760	0,00242
A2/A4	0	0,033360	0,22945
A2/A5	0	0,033360	0,22945
A3/A3	0	0,000010	0,00001
A3/A4	0	0,000180	0,00126
A3/A5	0	0,000180	0,00126
A4/A4	0	0,000010	0,00017
A4/A5	0	0,000180	0,00242
A5/A5	0	0,000010	0,00017
Alel	Pop. penetranca	Nepop. penetranca <sup>1</sup>	Nepop. penetranca <sup>2</sup>
A1	1,00	0,912046	0,53337
A2	1,00	0,956540	0,91223
A3	0	0,038500	0,02196
A4	0	0,038500	0,26620
A5	0	0,038500	0,26620

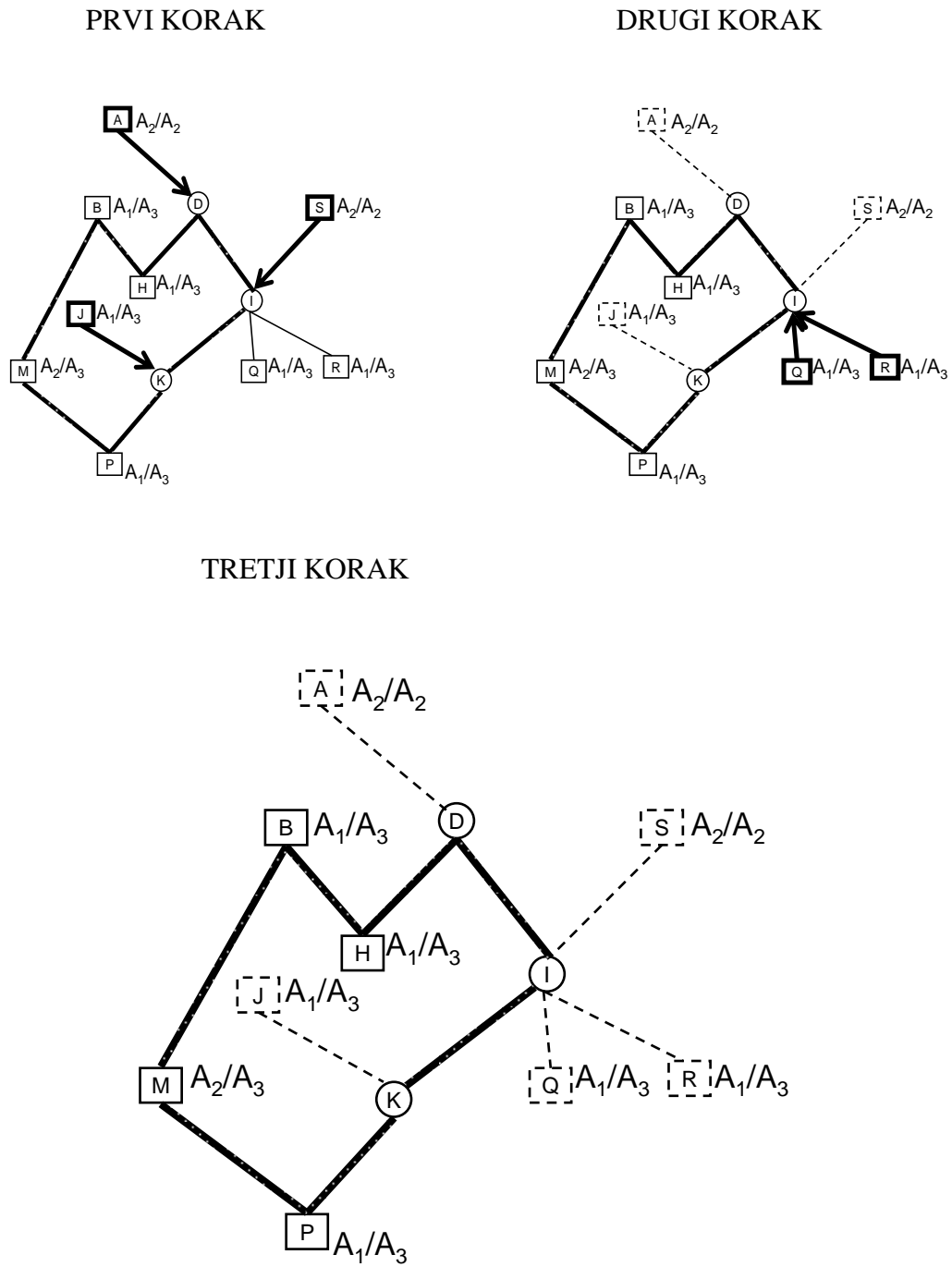
<sup>1</sup> - osebek G smo izključili iz analize; <sup>2</sup> - osebek G smo obdržali v analizi

Izračunali smo tudi verjetnosti, da osebek A nosi posamezne alele. Ob uporabi modela popolne penetrance je jasno, da osebek A nosi alel A<sub>1</sub> in alel A<sub>2</sub>. Če pri izračunu uporabimo model nepopolne penetrance in izločimo »kritičen« osebek G iz analize, se verjetnosti za alel A<sub>1</sub> in alel A<sub>2</sub> zmanjšajo, vendar so še vedno zelo velike. Ob tretji možnosti, ko osebk G ne izločimo iz analize, pa se verjetnosti, da ima osebek A določen alel porazdelijo. Zaradi upoštevanja osebk G z genotipom A<sub>4</sub>/A<sub>5</sub> v analizi so verjetnosti za to, da osebek A nosi alel A<sub>4</sub> ali A<sub>5</sub> višje. Ta primer prikazuje, da model nepopolne penetrance porazdeli verjetnost genotipov za posamezen osebek med možne genotipe (Preglednica 9). Rezultati seveda niso tako uporabni, a nam po drugi strani metoda

omogoča izračun verjetnosti genotipov za posamezen osebek v rodovniku tudi kadar so prisotne napake v rodovniku. Pri spremljanju rodovnika ovc in genotipizaciji se v rodovnikih in tudi pri genotipizaciji pojavljajo različne napake, zato je uporaba modela nepopolne penetrance pri izračunu verjetnosti genotipov PrP več kot dobrodošla.

### **3.4.1 Iterativno alelnu luščenje**

V točki 2.3.2 smo opisali delovanje metode alelnega luščenja na enostavnem rodovniku. V tem primeru je bila uporaba te metode direktna. Na žalost so rodovniki v živinoreji veliko bolj kompleksna in ne dovoljujejo direktne uporabe metode. Največji problem povzročajo zanke v rodovnikih. Zanke se pojavljajo v rodovnikih zaradi parjenja v sorodstvu. Algoritem začne »luščiti« rodovnik vse do zanke, kjer se ustavi. Ustavi se zato, ker v zanki ne more identificirati končnih staršev oziroma končnih potomcev. Thallman in sod. (2001a) je predstavil primer, kjer je B mati od M in tako ustvaril zanko (slika 12). Z direktno metodo lahko iz rodovnika odrežemo le končne starše (A, J in S) (korak 1, slika 12) ter končne potomce (Q in R) (korak 2, slika 11). V tretjem koraku sta končna starša B in D. Žal pa ne moremo prenesti informacije npr. z B na H, saj je B preko zanke povezan sam s seboj. Torej verjetnosti genotipov za osebek I ne moremo izračunati, saj ne moremo »razbiti« zanke z luščenjem. In tako se ustvari začaran krog. V Thallmanovem primeru gre za začaran krog osebkov I-K-P-M-B-H-D-I, kjer je I povezan s seboj preko osebkov K in D (korak 3, slika 11). Problem z zankami so prvi rešili Janss in sod. (1995), ki so opisali metodo iterativnega genotipskega luščenja, ki lahko dela z zankami. Za alelnu luščenje je Thallman in sod. (2001b) prav tako predstavil iterativno rešitev.



Slika 12: Alelnu luščenje in zanka v rodovniku



## 4 MATERIAL IN METODE

### 4.1 MATERIAL

Podatke o genotipu živali in rodovnikih smo zbrali iz podatkovne zbirke za drobnico na Centru za strokovno delo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete. Podatki so bili zbrani pri rejcih, ki so vključeni v kontrolo rodovnika in proizvodnje. Zajeli smo podatke sedmih pasem ovc: jezersko-solčavska (JS), oplemenjena jezersko-solčavska (JSR), belokranjska pramenka (BP), teksel (T), bovška (B), oplemenjena bovška (VFB) in istrska pramenka (IP). Naštete pasme ovc so vključene v program za povečevanje genetske odpornosti na TSE. Genotipizacija poteka od druge polovice leta 2005. Tako je bilo do konca leta 2007 genotipiziranih že več kot 10.000 ovc in ovnov (Preglednica 10).

V segregacijsko analizo smo vključili tudi rodovnik. Najprej smo ločeno po pasmah sestavili popolne rodovnike. Ti rodovniki so bili sestavljeni iz vseh živih in mrtvih plemenskih živali, ki so bile zapisane v rodovniških knjigah. Določene živali niso prispevale nobenih informacij za izračun verjetnosti genotipov. Takšne živali smo odstranili iz rodovnika. Izločanje teh živali je potekalo v smeri od prednikov do potomcev. Iz rodovnika smo izločili živali, ki:

- so bile že mrtve,
- so imele enega potomca in
- niso bile genotipizirane.

Največ živali (15.054; Preglednica 11) smo zajeli pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi. Po številu živali v rodovniku ji je sledila jezersko-solčavska pasma s 10.429 živalmi ter bovška pasma s 5.101 živalmi. Rodovniki ostalih pasem so bili manjši, kar tudi odraža številčno zastopanost pasem v Sloveniji. Največji delež živali z znanim genotipom PrP je bil pri belokranjski pramenki (61,2 %; Preglednica 10). Znatno delež živali z znanim genotipom PrP je še pri bovški (36,5 %) ter jezersko-solčavski (35,2 %) in istrski pramenki (33,4 %) pasmi. Pri drugih pasmah je bil delež živali z znanim genotipom manjši od 30 %. Živali z velikim številom sorodnikov so za izračun verjetnosti genotipov zelo informativne. Največji delež očetov z znanim genotipom PrP je bil pri istrski pramenki (41,0 %), medtem ko je bil ta delež pri ostalih pasmah nižji od 30 %. Deleži mater z znanim genotipom PrP so bili tudi do enkrat višji (Preglednica 11). Pri pasmi teksel je bil delež mater z znanim

genotipom PrP znašal le 1,0 %, vzrok tiči v dejstvu, da se program genotipizacije v tropih pasme teksel še ni začel izvajati. Največje število živih živali brez znanega genotipa PrP, je bilo pri najštevilčnejši pasmi oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (3.795 živali, Preglednica 10). Sledi jezersko-solčavska pasma s 2.673 živimi živalmi brez znanega genotipa PrP.

Preglednica 10: Struktura podatkov

Pasma	Število živali	Znan genotip (%)			Število živih negenotipiziranih živali
		Živali	Očetje	Matere	
JS	10429	35,2	28,7	40,9	2673
JSR	15054	18,5	11,8	20,0	3795
BP	1297	61,2	27,0	70,3	159
T	555	16,8	15,4	1,0	462
B	5101	36,5	9,8	16,5	522
VFB	1711	26,7	8,9	23,7	128
IP	1936	33,4	41,0	48,7	263

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka;

#### 4.2 METODE

Predstavljene podatke (genotipe PrP in rodovnike) smo uporabili za izračun verjetnosti posameznih genotipov PrP živalim z neznanim genotipom. Izračun verjetnosti genotipov je temeljil na verjetnostnem računu. Za izračun smo uporabili program GenoProb (Thallman, 2002), ki uporablja metodo alelnega luščenja (ang. allelic peeling; Thallman in sod., 2001a; Thallman in sod. 2001b). Metoda alelnega luščenja iterativno izračunava verjetnosti genotipov posameznikov v rodovniku, kot funkcijo verjetnosti genotipov pri prednikih in potomcih. Za osnovalce (živali, ki nimajo znanih prednikov ter neznan genotip), program predpostavi, da so vsi možni genotipi enako verjetni. Pri spremljanju rodovnika in genotipizaciji so možne napake. Zaradi tega dejstva smo uporabili model nepopolne penetrance (Thallman in sod., 2001a), kjer se zbrani podatki o genotipu uporabijo kot fenotipska vrednost. Morebitno odstopanje med »fenotipom« in izračunanimi verjetnostmi, se lahko uporabi za preliminarno odkrivanje napak genotipizacije in točnosti rodovnika.

Za vsako žival smo za izračun verjetnosti genotipov pridobili vektor verjetnosti ( $\mathbf{g}$ ) za vseh 15 možnih genotipov PrP (1). Genotipi PrP se glede na dovzetnost za okužbo s praskavcem delijo v pet skupin NSP (Dawson in sod., 2008; Preglednica 4). Tako smo tudi

izračunali verjetnosti, da je žival uvrščena v določeno skupino NSP ( $\mathbf{n}$ ). Verjetnost skupin NSP smo izračunali kot vsoto verjetnosti genotipov v določeni skupini (2).

$$\mathbf{g}' = [\text{Pr}(ARR/ARR), \text{Pr}(ARR/AHQ), \dots, \text{Pr}(VRQ/VRQ)] \quad \dots (1)$$

$$\mathbf{n}' = [\text{Pr}(NSP_1), \text{Pr}(NSP_2), \dots, \text{Pr}(NSP_5)] \quad \dots (2)$$

Za živali brez podatkov o genotipu PrP smo izračunali tudi povprečno vrednost NSP ( $\overline{NSP}$ ), kot tehtano povprečje števil od 1 do 5 ( $\mathbf{a} = [1, 2, 3, 4, 5]$ ), pri čemer smo tehtali z verjetnostmi za skupine NSP ( $\mathbf{n}$ ) (4). Za primerjavo smo izračunali tudi povprečno vrednost NSP za celotno populacijo ( $\overline{NSP}_p$ ) kjer smo uporabili verjetnosti skupin NSP izračunanih iz frekvence genotipov PrP v celotni populaciji.

$$\overline{NSP} = \mathbf{a}' * \mathbf{n} \quad \dots (4)$$

Za prikaz zgoraj definiranih parametrov bomo predstavili en primer. V ta namen smo analizirali podatke za negenotipizirano žival jezersko-solčavske pasme, pri kateri smo najprej izračunali verjetnost posameznih genotipov na osnovi genotipa sorodnikov. Tako smo izračunali verjetnosti posameznih genotipov PrP ( $\mathbf{g}$ ) in skupine NSP ( $\mathbf{n}$ ).

$$(\mathbf{g}) = \begin{bmatrix} 0,0286 & ARR / ARR \\ 0,0588 & ARR / AHQ \\ 0,0257 & ARR / ARH \\ 0,1930 & ARR / ARQ \\ 0,0303 & AHQ / AHQ \\ 0,0263 & AHQ / ARH \\ 0,1987 & AHQ / ARQ \\ 0,0058 & ARH / ARH \\ 0,0868 & ARH / ARQ \\ 0,3260 & ARQ / ARQ \\ 0,0034 & ARR / VRQ \\ 0,0035 & AHQ / VRQ \\ 0,0015 & ARH / VRQ \\ 0,0114 & ARQ / VRQ \\ 0,0001 & VRQ / VRQ \end{bmatrix}$$

$$(\mathbf{n}) = \begin{bmatrix} 0,0286 & NSP1 \\ 0,2775 & NSP2 \\ 0,6773 & NSP3 \\ 0,0035 & NSP4 \\ 0,0131 & NSP5 \end{bmatrix}$$

S pomočjo formule (4) smo izračunali predstavljeno povprečno vrednost NSP za to žival (8).

$$\overline{NSP} = 3,67$$

(8)

Povprečna vrednost NSP za jezersko-solčavsko pasmo ( $\overline{NSP}_p$ ) je bila 2,80, kar pomeni, da ima žival višjo povprečno vrednost NSP od povprečne vrednosti NSP za celotno pasmo in je po tem parametru ne bi vključiti v nabor za odbiro živali primernih za nadaljno rejo.

## 5 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 5.1 FREKVENCE ALELOV

Za izračun verjetnosti genotipov je poleg števila živali z znanim genotipom in strukture rodovnika vpliva tudi frekvenca alelov. Tako je bilo v okviru programa povečevanja odpornosti za okužbo s praskavcem ugotovljenih šest alelov: ARR, AHQ, ARH, ARQ, VRQ in VRR. Alel VRR je bil določen le v enem primeru in smo ga zato izločili iz analize. Izločili smo ga zaradi dejstva, ker nam verjetnosti posameznih genotipov še zmanjša in s tem še oteži delo. Frekvence alelov (Preglednica 11) smo izračunali kot enostavne deleže in pri tem nismo upoštevali sorodstvenih povezav med posamezniki (npr. Boehnke, 1991). Za vse pasme, razen za pasmo teksel, je bila značilna visoka frekvenca alela ARQ (od 50,0 do 69,7 %). Frekvenca nezaželenega alela VRQ je bila pri vseh pasmah manj kot pet odstotkov. Frekvenca zaželenega alela ARR je bila višja od frekvence nezaželenega VRQ in sicer okoli 20 % pri jezersko-solčavski, oplemenjeni jezersko-solčavski, bovški in oplemenjeni bovški pasmi. Pri pasmi Teksel je delež zaželenega alela (ARR) znašal kar 52,7 %, pri pasmi Belokranjska pramenka je bil delež 35,0 %, pri Istrski Pramenki pa 32,5 %. Frekvenca alelov AHQ in ARH se je gibala različno, in sicer med 0,1 in 24,6 %. Lühken in sod. (2008) so ocenili frekvence genotipov PrP in alelov za 56 pasem iz 15 držav Evrope in Bližnjega vzhoda (Preglednica 6). V njihovem primeru so se frekvence posameznih alelov med pasmami še bolj razlikovale kot v našem primeru. Ob spremljanju frekvenc posameznih alelov smo spremljali tudi heterozigotnost na lokusu PrP. Frekvenca vseh heterozigotov se je gibala med 47 % pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi do 64 % pri oplemenjeni bovški ter teksel pasmi. Glede na to, da je določanje genotipov potomcev najenostavneje pri homozigotih starših, nam ta podatek govori o tem, da določanje genotipov PrP ne bo tako enostavno.

Preglednica 11: Frekvence alelov PrP (%) in heterozigotnost (He) po pasmah

Pasma	Alel					He
	ARR	AHQ	ARH	ARQ	VRQ	
JS	17,4	7,4	8,3	63,2	3,7	0,56
JSR	17,7	7,9	0,9	69,7	3,8	0,47
BP	35,0	4,3	0,7	58,6	1,4	0,53
T	52,7	4,8	12,4	26,3	3,8	0,64
B	16,9	17,4	7,6	57,1	1,0	0,61
VFB	22,0	24,6	2,5	50,0	0,9	0,64
IP	32,5	7,5	0,1	57,2	2,7	0,56

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka

Preglednica 12: Frekvence skupin NSP (v %) po pasmah

Pasma	Skupina NSP				
	1	2	3	4	5
JS	3,5	26,7	62,7	1,1	6,0
JSR	2,8	28,2	61,4	1,5	6,1
BP	11,6	45,8	39,0	0,8	2,8
T	23,7	55,8	14,0	2,2	4,3
B	3,5	26,4	68,2	0,5	1,4
VFB	4,0	27,5	66,8	0,2	1,5
IP	13,1	37,6	44,5	1,3	3,5

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka

## 5.2 USPEŠNOST DOLOČITVE GENOTIPA PrP IN SKUPINE NSP

### 5.2.1 Uspešnost določitve genotipa PrP

V nadaljevanju predstavljamo rezultate le za žive živali, saj so le te živali zanimive za selekcijo. Vsaki živi živali smo izračunali verjetnosti za vseh 15 genotipov PrP. Uspešnost segregacijske analize smo definirali kot število dodatno potrjenih ali ovrženih genotipov PrP. Če je bila verjetnost za en genotip 100 %, smo lahko ta genotip potrdili z gotovostjo. Uspešnost analize smo preverili tudi pri 99 in 95 % verjetnosti določitve. Iz petih različnih alelov, je možno tvoriti 15 genotipov. Tako je število potencialnih genotipov, ki jih lahko potrdimo ali ovržemo, v razmerju 1:14.

Z gotovostjo nismo dodatno potrdili genotipa PrP niti za eno žival (Preglednica 15). Z 99 % verjetnostjo smo največ genotipov potrdili pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (105) in pri jezersko-solčavski pasmi (66). Pri ostalih pasmah je bilo število živali s potrjenim genotipom PrP manjše ali celo nič, saj pri pasmah teksel in belokranjska pramenka niti z 99 % verjetnostjo nismo potrdili nobenega genotipa. Tako je delež živali, ki smo jim dodatno potrdili genotip PrP z 99 % verjetnostjo znašal med 5,5 % pri oplemenjeni bovški pasmi pa do nič odstotkov pri bovški pasmi in pasmi teksel.

Pri 95 % verjetnosti določitve je bil uspeh večji. Tako smo s 95 % verjetnostjo potrdili genotip PrP pri 459 živalih. Največ živalim smo potrdili genotip PrP pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (145) in pri jezersko-solčavski pasmi (101). Pri ostalih pa smo genotip PrP potrdili manj živalim in sicer od nič živali s potrjenim genotipom PrP pri pasmi teksel do 22 pri bovški pasmi. Delež živali, ki smo jim dodatno potrdili genotip PrP s 95 % verjetnostjo so se gibali od 5,7 % pri istrski pramenki do nič odstotkov pri pasmi teksel. Pri ostalih pasmah živali je ta delež znašal med 3 in 5,5 %.

Število ovrženih genotipov je bilo v absolutnem smislu večje, vendar pa je bil delež uspešnosti podoben kot pri potrjenih genotipih. Tako smo z 99 % verjetnostjo ovrgli 4091 genotipov PrP pri različnih pasmah, kar predstavlja 7,1% od vseh možnih genotipov. Največ genotipov smo ovrgli pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (1663) in jezersko-solčavski pasmi (1487). Pri ostalih pasmah je bilo število ovrženih genotipov PrP nižje in je znašalo od 456 ovrženih genotipov pri bovški pasmi do le 83 ovrženih genotipov pri

oplemenjeni bovški pasmi. Tako je bil najvišji delež ovrženih genotipov PrP pri bovški pasmi (17,5 %) in istrski pramenki (12,5 %). Delež ovrženih genotipov pri ostalih pasmah je nižji in sicer od 4,8 % pri pasmi teksel do 2,9 % pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi.

Ko smo verjetnost ovržbe posameznega genotipa znižali na 95 %, se je število ovrženih genotipov v absolutnem in tudi relativnem smislu še povečalo. Ko smo s 95 % verjetnostjo ovrgli 7013 genotipov PrP, kar znaša 7,7 % delež od vseh možnih genotipov pri vseh pasmah živali. Največ genotipov PrP smo ponovno ovrgli pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (3495) in pri jezersko-solčavski pasmi (2333). Pri ostalih pasmah je bilo število ovrženih genotipov PrP nižje od 1000 genotipov (491 pri bovški pasmi, 223 pri istrski pramenki, ...). Najvišji delež ovrženih genotipov smo zabeležili pri pasmi istrska pramenka (17,0 %). Delež ovrženih genotipov PrP pri ostalih pasmah je nižji in se giblje okrog 5 %.



Preglednica 13: Število dodatno potrjenih ali ovrženih genotipov PrP pri različnih verjetnostih po pasmah

Pasma	Dodatno potrjenih genotipov PrP			Dodatno ovrženih genotipov PrP		
	Verjetnost	1,00	0,99	0,95	1,00	0,99
<b>JS</b>						
Število	0	66	101	0	1487	2333
Delež (v %)	0	2,5	3,8	0	3,7	5,8
<b>JSR</b>						
Število	0	105	145	0	1663	3495
Delež (v %)	0	2,8	3,8	0	2,9	6,1
<b>BP</b>						
Število	0	0	9	0	136	183
Delež (v %)	0	0	5,7	0	4,8	6,5
<b>T</b>						
Število	0	0	0	0	136	183
Delež (v %)	0	0	0	0	4,8	6,5
<b>B</b>						
Število	0	11	22	0	419	491
Delež (v %)	0	2,1	4,2	0	5,4	6,3
<b>VFB</b>						
Število	0	7	7	0	83	105
Delež (v %)	0	5,5	5,5	0	4,3	5,5
<b>IP</b>						
Število	0	10	15	0	164	223
Delež (v %)	0	3,8	5,7	0	12,5	17,0

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka

### 5.2.2 Uspešnost določitve skupine NSP

Pri skupinah NSP je bila uspešnost segregacijske analize le malo boljša (Preglednica 16). Z gotovostjo ni bila dodatno potrjena nobena skupina NSP za posamezno žival. Z 99 % verjetnostjo smo dodatno potrdili skupino NSP pri 561 živalih, kar znaša 8,3 % od vseh negenotipiziranih živali. Največ skupin NSP je bilo potrjenih pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (213) in jezersko-solčavski pasmi (209). Pri ostalih pasmah je bilo dodatno potrjenih skupin NSP pri posameznih živalih okrog 100 ali manj (pri bovški pasmi 101, oplemenjeni bovški pasmi 26, ...). Najvišji delež živali, ki smo jim potrdili skupino NSP je bil zabeležen pri oplemenjeni bovški pasmi (20,3 %) in bovški pasmi (19,3 %) živalmi z dodatno potrjeno skupino NSP. Pri ostalih pasmah je delež živali z dodatno potrjeno skupino NSP nižji od 10 % (7,8 % pri jezersko-solčavski pasmi, 5,6 % pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi, ...).

S 95 % verjetnostjo smo dodatno potrdili skupino NSP pri 817 živalih, kar znaša 13,1 % od vseh negenotipiziranih živali. Največ jih je bilo potrjenih pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (293) in pri jezersko-solčavski pasmi (283), sledi bovška pasma s 182 dodatnimi živalmi s potrjeno skupino NSP. Pri ostalih pasmah smo dodatno potrdili skupino NSP pri manj kot 100 živali. Tako smo s 95 % verjetnostjo dodatno potrdili skupino NSP 34,9 % živalim bovške pasme, sledi oplemenjena bovška pasma s 25,8 % deležem negenotipiziranih živali. Pri jezersko-solčavski pasmi je ta delež znašal 10,6 %, pri ostalih pasmah pa je bil nižji od 10 %.

Število ovrženih skupin NSP je bilo v absolutnem smislu seveda bistveno večje kot pri genotipu PrP, relativno gledano pa so rezultati dokaj podobni. Tako smo lahko z 99 % verjetnostjo ovrgli 3987 skupin NSP, kar predstavlja 11,7 % delež od vseh možnih skupin NSP. Največ skupin NSP je bilo ovrženih pri jezersko-solčavski pasmi (1583) in pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (1469). Pri ostalih pasmah je bilo število ovrženih skupin NSP nižje od 500 (456 pri bovški pasmi, 170 pri istrski pramenki, ...). Najvišji delež ovrženih skupin NSP smo zabeležili pri bovški (17,5 %) in oplemenjeni bovški pasmi (17,3 %). Pri belokranjski pramenki pa smo ovrgli nekaj več kot 14 % od vseh skupin NSP. Deleži ovrženih skupin NSP pri ostalih pasmah so bili nižji.

S 95 % verjetnostjo smo dodatno ovrgli 7063 skupin NSP, kar znaša 16,6 % od vseh možnih skupin NSP v analizi. Največ skupin NSP smo ovrgli pri oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (3402) in jezersko-solčavski pasmi (2488). Sledi bovška pasma, pri kateri smo ovrgli 512 skupin NSP. Pri ostalih pasmah pa je bilo število dodatno ovrženih skupin NSP nižje od 500. Deleži ovrženih skupin NSP se gibljejo nekaj pod 20 %, najvišji delež je bil zabeležen pri bovški pasmi (19,6 %), najnižji pa pri istrski pramenki (5,9 %).

Preglednica 14: Število dodatno potrjenih ali ovrženih skupin NSP pri različnih verjetnostih po pasmah

Pasma	Dodatno potrjene skupine NSP			Dodatno ovržene skupine NSP		
	Verjetnost	1,00	0,99	0,95	1,00	0,99
<b>JS</b>						
Število	0	209	283	0	1583	2488
Delež (v %)	0	7,8	10,6	0	11,8	18,6
<b>JSR</b>						
Število	0	213	293	0	1469	3402
Delež (v %)	0	5,6	7,7	0	7,7	17,9
<b>BP</b>						
Število	0	2	11	0	123	148
Delež (v %)	0	1,3	6,9	0	15,5	18,6
<b>T</b>						
Število	0	0	1	0	75	158
Delež (v %)	0	0	0,5	0	7,9	16,7
<b>B</b>						
Število	0	101	182	0	456	512
Delež (v %)	0	19,3	34,9	0	17,5	19,6
<b>VFB</b>						
Število	0	26	33	0	111	123
Delež (v %)	0	20,3	25,8	0	17,3	19,2
<b>IP</b>						
Število	0	10	14	0	170	232
Delež (v %)	0	3,8	5,3	0	4,3	5,9

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka

### 5.2.3 Razprava uspešnosti določitve genotipa PrP in skupine NSP

Absolutno število dodatno potrjenih genotipov PrP in skupin NSP ni zanemarljivo. Teh živali tako ni potrebno genotipizirati, kar vključno z zbiranjem vzorcev na terenu predstavlja prihranek. Sicer pa lahko iz zbranih rezultatov povzamemo, da uspešnost določitve genotipa PrP za naše populacije ovc ni bila velika. Različna struktura podatkov med pasmami (Preglednica 2) praktično ni vplivala na uspešnost. Razlog za tako slab uspeh lahko v veliki meri pojasnimo.

V analizo je bilo vključenih pet alelov za gen PrP: ARR, AHQ, ARH, ARQ in VRQ. Ti aleli so najpogostejši pri nas in tudi pri drugih populacijah, čeprav se še vedno odkrivajo novi aleli (Alvarez in sod., 2006; Lühken in sod., 2008; Ulvund, 2008;). S petimi aleli je možno tvoriti 15 različnih genotipov, kar je sorazmerno veliko. Kot poročata Tier in Henshall (2005) sta Elston in Stewart (1971) razvila metodo za izračun verjetnosti genotipov za populacije ljudi, kjer so običajno problemi omejeni na manjše število družin in lokuse z redkimi letalnimi aleli. V takšnih primerih je cilj določitev nosilcev letalnega alela, ne pa tudi verjetnosti vseh genotipov za vse posameznike v rodovniku. Tier in Henshall (2005) sta s pomočjo simulacij pri mesnem govedu, ovcah in prašičih ugotovila, da je možno določiti genotip z gotovostjo le v primerih, ko je alelov malo in je njihova frekvenca zelo različna. Na takšnih primerih temelji metoda Elstona in Stewarta (1971). V našem primeru izračunavanja verjetnosti genotipov PrP smo imeli večje število alelov z intermediarnimi frekvencami. Kinghorn (1999) je s simulacijo prikazal, da lahko v primeru dveh alelov, modelom popolne penetrance in 10, 20 ali 80 % genotipiziranih živali dosežemo okoli 50, 60 ali celo 100 % uspeh. Vendar pa mi nismo imeli na voljo ne tako velikega deleža genotipiziranih živalih, prav tako pa tudi več možnih alelov, zaradi napak v podatkih pa ni bila tudi mogoča uporaba modela popolne penetrance.

Naslednja omejitev za večjo uspešnost določitve genotipa PrP so bile uporabljene apriorne verjetnosti pri osnovalcih (ang. founder). To so začetne verjetnosti genotipov za živali, ki so na »vrhu« rodovnika in nimajo podatka o genotipu PrP. Za takšne živali je Thallman (2002) v programu GenoProb predpostavil, da so verjetnosti vseh genotipov enake (uniformne) – v našem primeru 1/15. Takšna predpostavka je najbolj priročna, saj je najbolj neinformativna. Pri določanju genotipov se apriorne verjetnosti preko verjetnostnega računa uporabijo naprej pri drugih sorodnikih. Kadar genotip ni mogoče določiti z gotovostjo (npr. pri heterozigotnih starših), se verjetnosti genotipov od prednikov prenašajo na potomce skozi celoten rodovnik. To posledično poslabša uspeh določitve genotipov z gotovostjo. Namesto enakih verjetnosti za vse genotipe, bi lahko za apriorne verjetnosti uporabili frekvence genotipov iz zbranih podatkov. Vendar sta Tier in Henshall (2002) to odsvetovala, saj so lahko frekvence alelov pri osnovalcih povsem drugačne kot v zbranih podatkih. Poleg tega so lahko frekvence alelov v posameznih družinah različne. Za apriorne verjetnosti osnovalcev bi lahko uporabili ocene frekvenc alelov pri začetnikih

(Bohenke 1991), a sta Kerr in Kinghorn (1996) s simulacijami ugotovila, da uniformna apriorna verjetnost zmanjša število napačno ocenjenih verjetnosti genotipov. Poleg tega uporabljeni program GenoProb ne omogoča vnosa lastnih apriornih verjetnosti.

Program povečevanja odpornosti ovc za okužbo s praskavcem izvajamo v Sloveniji od leta 2005. V našem primeru lahko živali razdelimo v tri skupine. Prvo skupino sestavljajo živali, ki imajo znan genotip PrP in so večinoma še žive. Drugo skupino sestavljajo predniki, ki praviloma nimajo znanega genotipa PrP in večinoma niso več živi. Tretjo skupino sestavljajo živali, ki nimajo znanega genotipa in so še žive. Genotip PrP želimo določiti za živali iz tretje skupine. Živali iz prve skupine so bile primarni vir informacij za določitev genotipov. Živali druge skupine pa so služile predvsem za povezovanje in boljši izkoristek teh informacij. V kolikor bi poznali genotip PrP tudi za nekaj prednikov, bi bil uspeh določitve genotipov večji, kar sta s simulacijami pokazala Kerr in Kinghorn (1996).

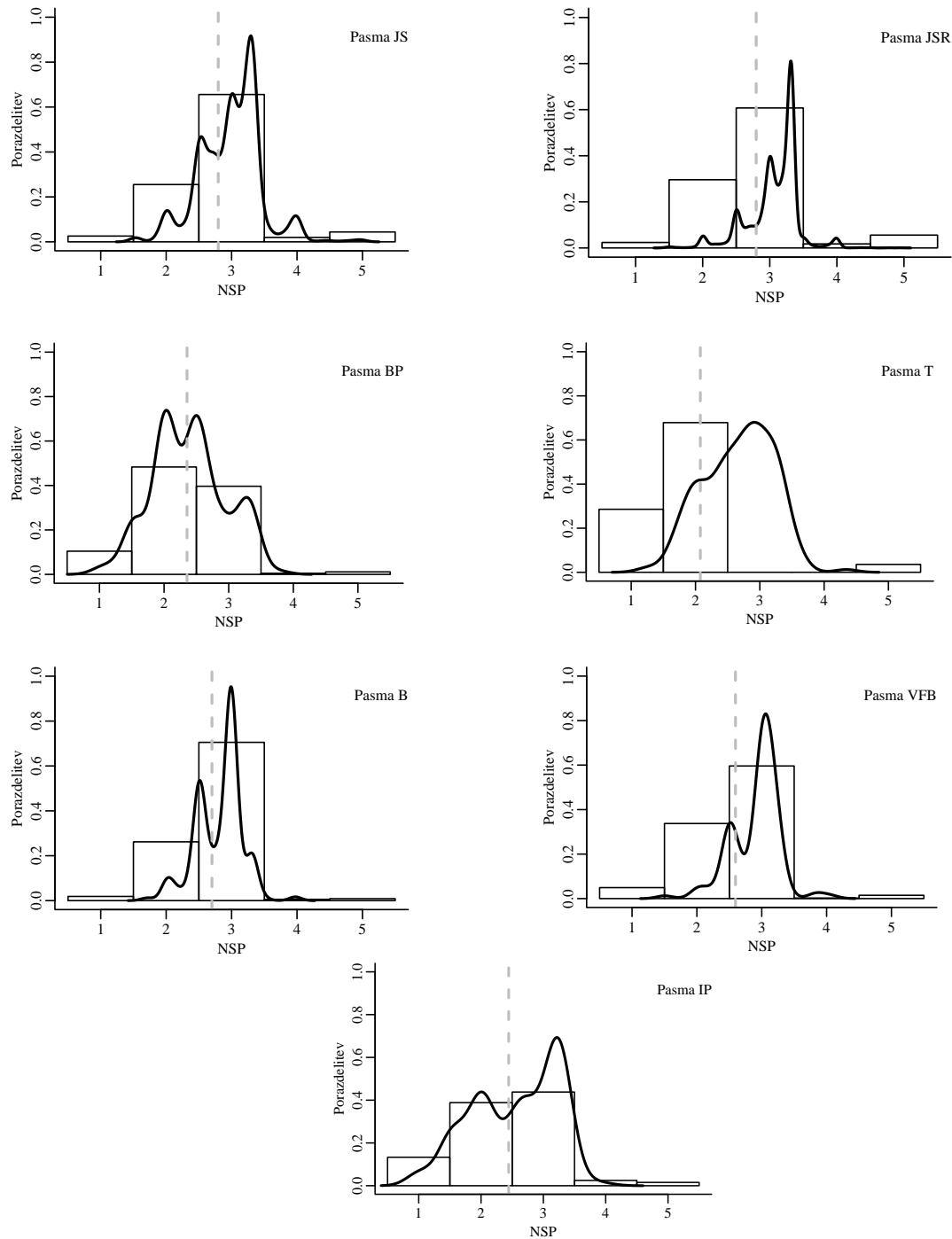
Razlog za slabši uspeh izračuna verjetnosti genotipov oziroma skupin NSP lahko iščemo tudi v dejstvu, da smo uporabili model nepopolne penetrance (Thallman in sod., 2001a). V primeru napak v podatkih (napačni genotipi ali napačen rodovnik) prihaja do razlik med laboratorijsko določenim genotipom in genotipom, ki ga določimo na podlagi prednikov, potomcev in partnerjev. Thallman in sod. (2001a) so z modelom nepopolne penetrance podatke o genotipih obravnavali kot fenotipsko informacijo. V kolikor se »fenotip« in predvidevani genotip ne ujemata, se izračunane verjetnosti genotipov ustrezno spremenijo preko penetrantne funkcije. Spremenjene verjetnosti se nato uporabijo pri izračunu verjetnosti genotipov ostalih sorodnikov v rodovniku. V kolikor je »fenotip« nedvoumno napačen, so verjetnosti za takšen genotip zelo majhne. Posledično pa majhne verjetnosti prispevajo k temu, da ni mogoče z gotovostjo določiti genotipa pri sorodnikih (Preglednica 15 in 16). Kljub omenjeni slabosti je uporaba modela nepopolne penetrance boljša izbira, saj nam namreč omogoča uporabo podatkov, ki vsebujejo napake. V kolikor ne bi uporabili tega modela, bi se algoritem alelnega luščenja ustavil pri vsakem posamezniku, katerega genotip se ne bi ujema z genotipi sorodnikov. Model popolne penetrance nas sicer opozarja na napake v podatkih, a je za rutinsko delo po našem mnenju neuporaben. Pri uporabljenih setih podatkov velikokrat nismo mogli določiti kateri »fenotip« je napačen ali pravilen. Napake so namreč možne pri enem ali več posameznikih hkrati. Za popolno

odpravo napak bi velikokrat morali še enkrat genotipizirati posamezne živali ali pa celotne družine.

### 5.3 POVPREČNA VREDNOST NSP

Selekcija na odpornost proti praskavcu pri ovcah temelji na izločevanju alela VRQ in povečevanju frekvence alela ARR. Za živali, ki še niso bile genotipizirane, smo skušali določiti genotip PrP in skupino NSP. Žal nismo bili tako uspešni, da bi lahko v selekcijo zajeli vse živali. Namesto tega lahko pri selekciji uporabimo verjetnosti genotipov. To so predlagali tudi Van Arendonk in sod. (1989). Zaradi velikega števila možnih genotipov PrP, smo raje izračunali povprečno vrednost NSP ( $\overline{NSP}$ , [3]).

Porazdelitev  $\overline{NSP}$  (za živali z neznanim genotipom PrP) se je v veliki meri ujemala s porazdelitvijo skupin NSP (za živali z znanim genotipom PrP) pri vseh pasmah ovc (Slika 14). Podobna porazdelitev je pričakovana, saj smo verjetnosti za genotipe PrP in skupine NSP določili na podlagi živali z znanim genotipom. Pri nekaterih pasmah smo zasledili izrazite vrhove pri porazdelitvi  $\overline{NSP}$  (npr. pri vrednostih 2, 2,5, itd.), kar je posledica načina izračuna  $\overline{NSP}$ .



Slika 13: Porazdelitev živali glede na povprečno vrednost NSP po pasmah stolpci - živali z znanim genotipom PrP, naložena krivulja - živali z neznanim genotipom PrP, naložena krivulja - živali z neznanim genotipom PrP, navpična črtkana črta - povprečna vrednost NSP v populaciji ( $NSP_p$ )

Za selekcijo na odpornost proti praskavcu odbiramo tiste živali, ki so v čim nižji skupini NSP. Namesto da bi odbirali samo med živalmi z znanim genotipom, lahko v nabor vključimo tudi živali, katerim smo izračunali  $\overline{NSP}$ . Za povečevanje odpornosti pasme bi odbirali živali, ki so pod povprečno vrednostjo NSP za celotno populacijo (Sliki 14). Z uporabo parametra  $\overline{NSP}$  smo skupaj dodatno vključili več kot 2000 živali (Preglednica 19). Tako jih je bilo za nadaljno odbiro po tem kriteriju skupaj dodatno vključenih 2034 živali v vseh slovenskih pasmah v rodovnik in kontroli proizvodnje. Največ takšnih živali je bilo pri jezersko-solčavski pasmi (879) in oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (726), pri bovški pasmi smo lahko dodatno v nabor vključili 185 živali. Pri ostalih pasmah je bilo za nadaljno rejo po tem kriteriju dodatno primernih manj kot 100 živali. Delež negenotipiziranih živali, primernih za nadaljni nabor po parametru povprečne vrednosti NSP, je bil najvišji pri belokranjski pramenki (45,9 %) in bovški pasmi (35,4 %). Najnižji delež (19,0 %) smo zabeležili pri pasmi teksel, kjer smo v nadaljno selekcijo dodatno lahko vključili le 36 živali.

S tem se na eni strani zmanjša pritisk na intenzivnost selekcije za ostale gospodarsko pomembne lastnosti pri ovcah in na drugi strani zmanjša parjenje v sorodstvu.

Preglednica 15: Odstotek živali z neznanim genotipom PrP, ki so pod povprečno vrednostjo NSP v populaciji

Pasma	Živih živali z neznanim genotipom PrP	Živih živali z neznanim genotipom PrP pod $\overline{NSP}_p$	% pod $\overline{NSP}_p$
JS	2673	879	32,9
JSR	3795	726	19,1
BP	159	73	45,9
T	189	36	19,0
B	523	185	35,4
VFB	128	32	25,0
IP	263	103	39,2

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka

Poleg naštetega, so verjetnosti genotipov uporabne za izračun indeksa verjetnosti genotipov (Kinghorn, 1997). Ta indeks nam omogoča izbiro posameznikov, ki so s stališča doprinosna novih informacij najbolj primerni za genotipizacijo (Kinghorn, 1999). Navsezadnje lahko verjetnosti genotipov vključimo v asociacijsko analizo učinkov alelov in genotipov kot so to npr. storili Vitezica in sod. (2005).



## 6 SKLEPI

Na podlagi zbranih podatkov o genotipu PrP in rodovnikih ovac smo izračunali verjetnosti genotipov PrP in skupin NSP za ovce in ovne, ki še niso bili genotipizirani.

Z gotovostjo nismo dodatno potrdili genotipa PrP niti za eno žival. Število dodatno potrjenih genotipov PrP je bilo le malo večje pri 99 % ali 95 % verjetnosti določitve negenotipiziranih živali. Tako smo z 99 % verjetnostjo dodatno potrdili genotip PrP pri 199 živalih (2,4 % od vseh negenotipiziranih živali). S 95 % verjetnostjo pa smo dodatno potrdili genotip PrP pri 299 živalih, kar znaša 4,1 % od vseh negenotipiziranih živali.

Prav tako nismo dodatno ovrgli nobenega genotipa PrP s 100 % verjetnostjo. Z 99 % smo lahko skupaj ovrgli 4088 genotipov PrP, kar predstavlja 5,5 % od vseh možnih genotipov. S 95 % verjetnostjo smo lahko ovrgli 7013 genotipov PrP, torej 7,7 % od vseh možnih genotipov pri vseh živalih.

Z gotovostjo nismo dodatno potrdili tudi nobene skupine NSP za posamezno žival. Število dodatno potrjenih skupin NSP je bilo le malo večje pri 99 % ali 95 % verjetnosti. Tako smo z 99 % verjetnostjo dodatno potrdili skupino NSP pri 561 živalih (8,3 % od vseh negenotipiziranih živali). S 95 % verjetnostjo pa smo dodatno potrdili skupino NSP pri 817 živalih, kar znaša 13,1 % od vseh negenotipiziranih živali.

Dodatno nismo ovrgli nobene skupine NSP s 100 % verjetnostjo. Z 99 % verjetnostjo smo lahko skupaj ovrgli 3987 skupin NSP, kar predstavlja 11,7 % od vseh skupin NSP. S 95 % verjetnostjo smo lahko ovrgli 7063 skupin NSP, torej 16,6 % od vseh skupin NSP pri vseh živalih.

Uspešnost določitve genotipov PrP in skupin NSP je torej bila slaba. Vzroke za slabo uspešnost lahko iščemo na več mestih: veliko število alelov, intermediarne frekvence alelov, uniformna apriorna verjetnost, struktura podatkov (genotipi znani samo za živali iz zadnjih generacij) in uporaba modela nepopolne penetrance.

Glede na to, da je uspešnost izračuna verjetnosti genotipov slaba, smo poskušali najti druge parametre, ki bi jih lahko uporabili pri selekciji na genotip PrP pri ovcah. Tako smo definirali povprečno vrednost NSP za posamezno žival.

Povprečna vrednost NSP zajema vse informacije v verjetnostih genotipov oziroma skupin NSP. Zato je ta parameter najbolj uporaben za selekcijo negenotipiziranih živali. Za selekcijo so zanimive živali, ki so uvrščene pod izračunano povprečno vrednostjo NSP v celotni populaciji. Takšnih živali je bilo pri vseh pasmah skupaj 2034, največ pri jezersko-solčavski pasmi (879) in oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (726). Na drugi strani pa je bil najvišji delež živali z neznanim genotipom PrP pod povprečno vrednostjo NSP v populaciji pri belokranjski pramenki (45,9 %).

## 7 POVZETEK

Praskavec je bolezen ovc in koz, ki tako kot BSE pri govedu, spada v skupino prenosljivih spongiformnih encefalopatij (ang. kratica TSE). V preteklosti praskavec v Sloveniji ni bil poznan, v zadnjih letih pa je bilo odkritih nekaj primerov pri ovcah. Prenosljive spongiformne encefalopatije ali prionske bolezni so skupina bolezni, pri katerih se v centralnem živčnem sistemu kopiči spremenjena oblika prionske beljakovine (Prusiner, 1998). Primarni povzročitelj teh bolezni do danes še ni poznan. Raziskovalci so ugotovili, da lahko v istem tropu zaradi praskavca nekatere ovce poginejo nekatere pa ne. To je privedlo do odkritja gena PrP, ki odločilno vpliva na odpornost proti praskavcu (Hunter, 1997). Razlike na 136., 154. in 171. kodonu gena PrP so najbolj povezane z odpornostjo oziroma dovzetnostjo za okužbo s praskavcem in starostjo nastopa bolezni (Hunter, 1997). Ker so omenjeni kodoni zelo blizu, se polimorfizmi na teh treh kodonih navajajo kot alel poimenovan z začetnicami aminokislin npr  $A_{136}R_{154}R_{171}$  ali kar ARR. Najbolj pogosti so aleli: ARR, AHQ, ARH, ARQ in VRQ. Številne raziskave so alel ARR povezale z odpornostjo, alel VRQ pa z največjo dovzetnostjo za okužbo s praskavcem (Hunter, 1997). Zaradi velikega števila možnih genotipov (15 v primeru petih alelov) in nejasnih odnosov med aleli, so v Veliki Britaniji razdelili genotipe v pet skupin (ang. National Scrapie Plan – NSP; Dawson in sod., 1998). Skupine NSP si sledijo od ena (največja odpornost) do pet (največja dovzetnost).

Praskavec je pri ovcah znan že več kot 250 let in do sedaj ni dokazov, da bi bil škodljiv za ljudi. Evropska komisija je sprejela uredbo, zaradi pojava BSE pri govedu, možnega spontanega prenosa praskavca z ovc na govedo in takrat še nezmožnosti ločitve praskavca

od BSE pri ovcah. Uredba državam članicam nalaga sprejetje programa selekcije na odpornost ovc proti praskavcu. Program je usmerjen v izločitev alela VRQ in povečevanju frekvence alela ARR. V Sloveniji smo takšen program začeli izvajati v letu 2005: Program predvideva genotipizacijo plemenskih ovnov in ovc ter na podlagi teh podatkov izvajanje selekcije.

Zbiranje vzorcev in genotipizacija sta še vedno relativno draga postopka. Genotip posameznika lahko v primeru točnega rodovnika določimo tudi iz genotipa sorodnikov. V splošnem lahko na podlagi genotipa sorodnikov s segregacijsko analizo izračunamo verjetnosti vseh možnih genotipov za posameznika.

V analizo smo vključili sedem pasem ovc, ki so vključene v rejske programe v Sloveniji: jezersko-solčavska, oplemenjena jezersko-solčavska, belokranjska pramenka, teksel, bovška, oplemenjena bovška in istrska pramenka. Naštete pasme ovc so vključene v program za povečevanje genetske odpornosti na TSE. Do konca leta 2007 je bilo genotipiziranih (136., 154. in 171. kodon gena PrP) že več kot 10.000 ovc in ovnov.

Podatke (genotipe PrP in rodovnike) smo uporabili za izračun verjetnosti genotipov. Določitev verjetnosti genotipov s segregacijsko analizo temelji na verjetnostnem računu. Mi smo za izračun uporabili program GenoProb (Thallman, 2002), ki uporablja metodo alelnega luščenja (Thallman in sod., 2001a; Thallman in sod. 2001b). S to metodo izračunamo verjetnosti genotipov iterativno, kot funkcijo verjetnosti genotipov pri prednikih, potomcih in partnerjih.

Pri spremljanju rodovnikov in genotipizaciji so možne napake, zato smo uporabili model nepopolne penetrance (Thallman in sod., 2001a), kjer se zbrani podatki o genotipu uporabijo kot fenotipska vrednost. Morebitno odstopanje med »fenotipom« in določenim genotipom s segregacijsko analizo, se lahko uporabi za preliminarno odkrivanje napak genotipizacije in točnosti rodovnika.

Za vsako ovco ali ovna smo s segregacijsko analizo pridobili vektor verjetnosti za vseh 15 možnih genotipov PrP. Prav tako pa smo izračunali verjetnosti skupine NSP, kot vsoto verjetnosti genotipov v določeni skupini. Za živali brez podatkov o genotipu PrP smo

izračunali še povprečno vrednost NSP, kot tehtano povprečje števil od 1 do 5, pri čemer smo tehtali z verjetnostmi za skupine NSP. Za primerjavo smo izračunali tudi povprečno vrednost NSP za celotno populacijo, kjer smo uporabili verjetnosti skupin NSP izračunanih iz frekvenca genotipov PrP v celotni populaciji.

Za segregacijsko analizo je poleg števila živali z znanim genotipom in strukture rodovnika pomembna tudi frekvenca alelov. Frekvenca alelov smo izračunali kot enostavne deleže in pri tem nismo upoštevali sorodstvenih povezav med posamezniki (Bohenke, 1991). Za vse pasme, razen za pasmo teksel, je bila značilna visoka frekvenca alela ARQ (od 26,3 do 69,7 %). Frekvenca alela VRQ (najbolj povezan z okužbo s praskavcem) je bila pri vseh pasmah manj kot pet odstotkov. Alel ARR (najbolj povezan z odpornostjo za okužbo s praskavcem) je bil bolj pogost kot alel VRQ in sicer okoli 20 % za jezersko-sočavsko pasmo, oplemenjeno jezersko-sočavsko pasmo, bovško pasmo in oplemenjeno bovško pasmo. Pri pasmi teksel je delež tega zaželenega alela znašal kar 52,7 %, pri belokranjski pramenki 35,0 % in pri istrski pramenki 32,5 %. Frekvenca alelov AHQ in ARH se je gibala med 0,1 in 24,6 %. Lühken in sod. (2008) so ocenili frekvenca genotipov PrP in alelov za 56 pasem iz 15 držav Evrope in Bližnjega vzhoda. Njihove ocene frekvenc alelov so se med pasmami razlikovale še bolj kot v našem primeru.

Zanimali so nas izračuni verjetnosti genotipov PrP za žive živali, saj so le te zanimive za selekcijo. Za vsako žival smo s segregacijsko analizo izračunali verjetnosti za vseh 15 možnih genotipov PrP. Uspešnost segregacijske analize smo ovrednotili s številom dodatno potrjenih ali ovrženih genotipov PrP in skupin NSP. V kolikor je bila verjetnost za en genotip 100 %, smo lahko ta genotip potrdili z gotovostjo. Uspešnost analize smo preverili tudi pri 99 in 95 % verjetnosti določitve genotipa. Pri petih alelih je možnih 15 genotipov. S tem je število potencialnih genotipov, ki jih lahko potrdimo ali ovržemo, v razmerju 1:14.

Z gotovostjo nismo dodatno potrdili genotip PrP ali skupino NSP niti za eno žival. Število dodatnih potrditev ali ovržb genotipa PrP je bilo le malo večje pri 99 in 95 % verjetnosti. Za 0 do 5,5 % živali različnih pasem smo lahko dodatno potrdili genotip PrP s 95 % verjetnostjo. Za vse pasme skupaj smo tako dodatno potrdili genotip PrP (s 95 %

verjetnostjo) pri 299 živalih. Delež živali, ki smo jim s 95 % verjetnostjo uspeli ovreči vsaj en genotip PrP se je gibal med 5,5 in 17,0 %. Uspešnost analize se med pasmami ni bistveno razlikovala, kljub temu, da je bila struktura podatkov med pasmami različna.

Pri skupinah NSP je bila uspešnost segregacijske analize le malo boljša. Najbolj smo bili uspešni pri oplemenjeni bovški in bovški pasmi, kjer smo z 99 % verjetnostjo dodatno potrdili 20,3 % (VFB) in 19,3 % (B) živali. Pri drugih pasmah je bil ta delež nižji. Deleži ovrženih skupin NSP so bili bistveno večji kot pri genotipu PrP. Za vse pasme skupaj smo dodatno potrdili skupino NSP pri 561 živalih z 99 % verjetnostjo in pri 817 živalih s 95 % verjetnostjo.

Absolutno število dodatno potrjenih genotipov PrP in skupin NSP ni zanemarljivo. Teh živali tako ni potrebno genotipizirati, kar vključno z zbiranjem vzorcev na terenu predstavlja prihranek. Sicer pa lahko iz zbranih rezultatov povzamemo, da uspešnost segregacijske analize za določitev genotipa PrP za naše populacije ovc ni bila velika. Razlog za tako slab uspeh lahko v veliki meri pojasnimo. Menimo, da so vzroki za slab uspeh: veliko število alelov, intermediarne frekvence alelov, struktura podatkov in uporaba modela nepopolne penetrance. Dodatne potrditve genotipa PrP in skupine NSP predstavljajo prihranek, a zaradi majhnega obsega niso uporabne za selekcijo celotne pasme na odpornosti proti praskavcu. V ta namen smo uporabili povprečno vrednost NSP, ki jo lahko izračunamo za vse živali.

Za selekcijo na odpornost proti praskavcu odbiramo tiste živali, ki so v čim nižji skupini NSP. Namesto, da bi odbirali samo med živalmi z znanim genotipom, bi lahko v nabor vključili tudi živali, katerim smo izračunali  $\overline{NSP}$ . Za povečevanje odpornosti pasme bi odbirali živali, ki so pod povprečno vrednostjo NSP za celotno populacijo. Z uporabo parametra  $\overline{NSP}$  smo v nabor za selekcijo pri vseh pasmah skupaj dodatno vključili več kot 2000 živali; največ pri jezersko-solčavski pasmi (879 živali) in oplemenjeni jezersko-solčavski pasmi (726 živali). S tem se na eni strani zmanjša pritisk na intenzivnost selekcije za ostale gospodarsko pomembne lastnosti pri ovcah in na drugi strani zmanjša parjenje v sorodstvu.

## 8 VIRI

- Alfonso L., Parada A., Legarra A., Ugarte E., Arana A. 2006. The effects of selective breeding against scrapie susceptibility on the genetic variability of the Latxa Black-Faced sheep breed. *Genetics Selection Evolution*, 38: 495-511
- Alvarez L., Arranz J.J., San Primitivo F. 2006. Identificatin of the new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep. *Journal of Animal Science*, 84: 259-265
- Baylis M., Goldman W. 2004. The Genetics of Scrapie in Sheep and Goats. *Current Molecular Medicine*, 4: 385-396
- Benestad S.L., Sarradin P., Thu B., Schönheit J., Tranulis M.A., Bratberg B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *The Veterinary Record*, 153: 202-208
- Prion Protein PrP. 2008. The Davidson College The Biology Faculty  
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Winter/Prion1new1.htm> (3. maj 2008).
- Boehnke M. 1991. Allele frequency estimation from data on relatives. *The American Journal of Human Genetics*, 48: 22-25
- Bossers A., Harders F.L., Smits M.A. 1999. PrP genotype frequencies of the most dominant sheep breed in contry free from scrapie. *Archives of Virology*, 144: 829-834
- Bosschere H., de Roels S., Van Opdenbosch E., 2004. Atypical case of bovine spongiform encephalopathy in an East-Flemish cow in Belgium. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 2: 52-54
- Brandsma J.H., Janss L.L.G., Visscher A.H. 2004. Association between PrP genotypes and littersize and 135 days weight in Texel sheep. *Livestock Production Science*, 85: 59-64

- Buschmann A., Lühken G., Schultz J., Erhardt G., Groschup M.H. 2004. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *The Journal of General Virology*, 85: 2727-2733
- Clinical signs of scrapie. 2008. Department for environment Food and Rural Affairs. Animal health and welfare (19. mar. 2008)  
<http://www.defra.gov.uk/animalh/Bse/othertses/scrapie/index.html> (25. maj 2008)
- Collinge J., Whittington M.A., Sidle K.C., Smith C.J., Palmer M.S., Clarke A.R. Jefferys J.G.R. 1994. Prion protein is necessary cantly in for normal synaptic function. *Nature*, 370: 295-297
- Dawson M., Moore R.C., Bishop S.C. 2008. Progress and limits of PrP gene selection policy. *Veterinary Research*, 39: 1-12
- Department for Environment, Food and Rural Affairs. 2008. BSE: Other TSEs – Scrapie. <http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/index.html> (22. maj 2008)
- Detwiler L.A., Baylis M. 2003. The epidemiology of scrapie. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 22: 121-143
- De Vries F., Hamann H., Drögemüller C., Ganter M., Distl O. 2004. Analysis of associations between the prion protein genotype and reproduction traits in meat sheep breeds. *Animal Science*, 79: 397-404
- De Vries F., Hamann H., Drögemüller C., Ganter M., Distl O. 2005. Analysis of associations between the prion protein genotype and production traits in East Friesian Milk Sheep. *Journal od Dairy Science*, 88: 392-398
- Dickinson A.G. 1976. Scrapie in sheep and goats. *Frontiers of Biology*, 44: 209-241
- Dickinson A.G., Outram G.W. 1988. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Novel Infectious Agents and The Central Nervous System*. Ciba Foundation, 135: 63-83

- Elston R.C., Stewart J. 1971. A general model for the genetic analysis of pedigree data. *Human Heredity*, 21: 523-542
- Fernández S.A., Fernando R.L., Guldbrandtsen B., Totir L.R., Carriquiry A.L. 2001. Sampling genotypes in large pedigrees with loops. *Genetics Selection Evolution*, 33: 337-367
- Fernando R.C., Stricker C., Elston R.C. 1993. An efficient algorithm to compute the posterior genotypic distribution for every member of a pedigree without loops. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 573-580
- Foster J.D., Hope J., Fraser H. 1993. Transmission of a bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *The Veterinary Record*, 133: 339-341
- Gavier-Widén D., Nöremark M., Benestad S., Simmons M., Renström L., Bratberg B., Elvander M., Segerstad C.H. 2004. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *Journal of the veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, 16: 562-567
- Gorjanc G., Kompan D. 2005. Praskavec in genotipizacija. *Drobnica*, 1: 3-6
- Gorjanc G., Kompan D. 2008. Use of genotype probabilities in selection on PrP genotype. *Small Ruminant Research* (v tisku)
- Gengler N., Mayeres P., Szydlowski M. 2007. A simple method to approximate gene content in large pedigree populations: application to the myostatin gene in dual-purpose Belgian Blue cattle. *The International Journal of Animal Biosciences*, 1: 21-28
- Henshall J.M., Tier B. 2003. An algorithm for sampling descent graphs in large complex pedigrees efficiently. *Genetics Research*, 78: 281-288
- Hoinville L.J. 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Scientific and Technical Review*, 15: 827-852



- Horwich A.L, Weissman J. 1997. Deadly Conformations-Protein Review Misfolding in Prion Disease. *Cell*, 89: 499-510
- Hunter N. 1994. The association of a codon 136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. *Archives of Virology*, 137: 171-177
- Hunter N. 1997. Molecular biology and genetics of scrapie in sheep. V: *The Genetics of Sheep*. Piper L., Ruvinsky A. (eds.). Wallingford, CAB International: 225-240
- Hunter N. 2007. Scrapie: uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772: 619-628
- Ikeda T., Horiuchi M., Ishiguro N., Muramatsu Y., Kai-Uwe G.D., Shinagawa M. 1995. Amino acid polymorphisms of PrP with reference to onset of scrapie in Suffolk and Corriedale sheep in Japan. *Journal of General Virology*, 76: 2577-2581
- Janss L.L.G., Thompson R., van Arendonk J.A.M. 1995. Application of Gibbs sampling for inference in a mixed major gene-polygenic inheritance model in animal populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1137-1147
- Jung M. 1996. Splošno o prenosljivih spongiformnih encefalopatijah. *Zdravstveni vestnik*, 65: 463-467
- Juntes P. 2004. Praskavec-prenosljiva spongiformna encefalopatija ovac in koz. *Kmečki glas*, 61, 29: 8
- Juntes P., Pogačnik M. 2004. Praskavec – najstarejša znana prenosljiva spongiformna encefalopatija. *Drobnica*, 9: 4-5
- Kerr R.J., Kinghorn B.P. 1996. An efficient algorithm for segregation analysis in large population. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 113: 457-469
- Kinghorn, B.P. 1997. An Index of Information Content for Genotype Probabilities Derived from Segregation Analysis. *Genetics*, 145: 479-483

- Kinghorn, B.P. 1999. Use of segregation analysis to reduce genotyping costs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116: 175-180
- Kutzler T., Pfeiffer I., Brenig B. 2002. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 119: 201-208
- Lühken G., Lipsky S., Peter S., Erhardt G. 2008. Prion protein polymorphisms in autochthonous European sheep breeds in respect to scrapie eradication in affected flocks. *Small Ruminant Research*, 75: 43-47
- Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M. 1993. PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics*, 15: 30-37
- Moore R.C, Hope J., McBride P.A., McConnell I., Selfridge J., Melton D.W., Manson J.C. 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nature Genetics*, 18: 118-125
- Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Moum T., Benestad S.L. 2005. Polymorphisms at codon 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *Journal of General Virology*, 86: 231-235
- Odločba komisije z dne 13. februarja 2003 o določitvi minimalnih pogojev za vzpostavitev rejskih programov za odpornost na transmisivne spongiformne encefalopatije pri ovcah (notificirano pod dokumentno številko K (2003) 498). Besedilo velja za EGP (2003/100/ES).
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:041:0041:01:SL:pdf>  
(21. maj 2008)
- Oesch B., Westaway D., Walchli M., McKinley M.P., Kent S.B., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., Prusiner S.B., Weissman C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40: 735-746

- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A.H., Ryder S.J., Parish S.M., Hamir S.M., Cockett N.E., Jenny A., Knowles D.P. 2000. Preclinical Diagnosis of Scrapie by Immunohistochemistry of Third Eyelid Lymphoid Tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, 9: 3254-3259
- Palhière I., Brochard M., Verrier K., Moazami-Goudarzi K., Amigues Y., Barillet B., Bed-Hom B., Bibé B., Bouix J., François D., Leymarie C., Pantano T. 2006. Did the selection for scrapie resistance impact the genetic variability? Preliminary results on four French sheep breeds. V: 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, 13-18 avg. 2006. Jouy-en-Jonas, Instituto Prociência: 31-10
- Pan K., Baldwin M., Nguyen J., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang. Z., Fletterick R. J., Cohen F. E., Prusiner, S. B. 2003. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 10962-10966
- Poser C.M. 2001. Notes on the history of the prion diseases. Part I. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 104: 1-9
- Prusiner S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216: 136-144
- Prion Lab. 2008. The Marist College Academic Technology group  
<http://www.academic.marist.edu/VBSC/viruslab/prion.htm> (10. maj 2008)
- Prokopova L., Lewis R.M., Dingwall W.S., Simm G. 2002. Scrapie genotype: A correlation with lean growth rate?. V: 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, 19-23 avg. 2002.
- Sawalha R.M., Brotherstone S., Conington J., Villanueva B. 2007. Lambs with Scrapie Susceptible Genotypes Have Higher Postnatal Survival. *Plos ONE*, 2: 1-5
- Smith G.P., Bradley R. 2003. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *British Medical Bulletin*, 66: 185-198

- Spraker T.R., Gidlewski T.L., Balachandran A., VerCauteren K.C., Creekmore L., Munger R.D. 2006. Detection of PrPCWD in postmortem rectal lymphoid tissues in Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) infected with chronic wasting disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18: 553–557
- Stahl N., Prusiner S.B. 1991. Prions in prion proteins. *The FASEB Journal*, 5: 2799-2807
- Schreuder B.E.C., van Keulen L.J.M., Smits M.A., Langeveld J.P.M., Stegeman J.A. 1997. Control of scrapie eventually possible?. *The Veterinary Quarterly*, 19: 105-113
- Scrapie. 2008. APHIS United States Department of Agriculture.  
[http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet\\_faq\\_notice/fs\\_ahscrapie.html](http://www.aphis.usda.gov/lpa/pubs/fsheet_faq_notice/fs_ahscrapie.html)  
(22. maj 2008)
- Sweney T., Hanrahan J.P. 2008. The Evidence of associations between prion protein genotype and production, reproduction and health traits in sheep. *Veterinary Research*, 39: 28
- Thallman R.M., Bennett G.L., Keele J.W., Kappes S.M. 2001a. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles:I. Allelic peelinc. *Journal of Animal Science*, 79: 26-33
- Thallman R.M., Bennett G.L., Keele J.W., Kappes S.M. 2001b. Efficient computation of genotype probabilities for loci with many alleles:II. Iterative method for large complex pedigrees. *Journal of Animal Science*, 79: 34-44
- Thallman R.M. 2002. User's Manual for GenoProb version 2.0 Computation of genotype and phase probabilities in complex pedigrees by allelic peeling. 1-18
- The rationale for ridding U.S. of scrapie. 2008. The American Veterinary Medical Association (1.maj 2002).  
<http://www.avma.org/onlnews/javma/may02/s050102g.asp> (28. apr. 2008)
- Thomsons R.G. 2001. Thomson's special veterinary pathology. 3rd ed. USA, St. Louis, Mosby: 768 str.

Thorgeirsdottir S., Sigurdarson S., Thorisson H.M., Georgsson G., Palsdottir A. 1999. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *Journal of General Virology*, 80: 2527-2534

Tier B., Henshall J.M. 2005. Limits to genotypic probabilities for single loci. V: *Application of new genetic technologies to animal breeding: Proceedings of the 16th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 25. sep. 2005, CSIRO, Noosa Lakes, Queensland, Australia 366-369

Tranulis M.A., Osland A., Ulvund M.J. 1999. Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *Journal of General Virology*, 80: 1073-1077

Ulvund M.J. 2008. *Ovine Acrapie disease: Do we have to live with it?*. *Small Ruminant Research* (v tisku)

Uredba št. (ES) 999/2001 Evropskega parlamenta in Sveta 999/2001 z dne 22. maja 2001 o določitvi predpisov za preprečevanje, nadzor in izkoreninjenje nekaterih transmisivnih spongiformnih encefalopatij  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001R0999:SL:HTML>  
(21. maj 2008)

Variant Creutzfeldt-Jakob disease current data (May 2008a). The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit (NCJDSU). <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm>  
(15. maj 2008)

Variant Creutzfeldt-Jakob disease. 2008b. World Organisation for Animal Health  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/> (29. maj 2008)

VURS. 2007. *Letno poročilo 2006*. Ljubljana, VURS: 52 str.  
[http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/Matjaz/Letna\\_porocila\\_VURS/Letno\\_porocilo\\_VURS\\_za\\_letno\\_2006\\_01.pdf](http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/Matjaz/Letna_porocila_VURS/Letno_porocilo_VURS_za_letno_2006_01.pdf) (17. jun. 2008)

Vitezica Z.G., Elsen J-M., Rupp R., Diaz C. 2005. Using genotype probabilities in survival analysis: a scrapie case. *Genetics Selection Evolution*, 37: 403-415

van Arendonk J.A.M., Kennedy B.W. 1989. Method to estimate genotype probabilities at individual loci in farm livestock. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 735-740

Westaway D., Zuliani V., Cooper C., Costa M.D., Neuman S., Jenny A.L., Detwiler L., Prusiner S.B. 1994. Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes & Development*, 8: 959-969

Woolhouse M.E.J., Stringer S.M., Matthews L., Hunter N., Anderson R.M. 1998. Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock. *Proceedings of The Royal Society Biological Sciences*, 265: 1205-1210

## ZAHVALA

Na prvem mestu se moram zahvaliti in ga z debelimi črkami označiti Gregorja Gorjanca, kateri je »kriv« za nastanek tega dela. Ni tako velikih in debelih črk, ki bi lahko opisale, koliko sem mu dožan in hvaležen za njegov čas, trud in potrpljenje. Še enkrat HVALA Gregor!

Potem se je nujno zahvalit mentorju doc. dr. Dragomirju Kompanu, ki je v ključnih trenutkih vzel stvari v svoje roke in zadevo pripeljal do tja kjer mora biti. Zahvala gre tudi somentorju prof. dr. Juriju Poharju in recenzentu prof. dr. Petru Dovču za natančen pregled in recenzijo dela.

Iskrena hvala tudi gospe Sabini, ki mi je bila vedno na razpolago ob mojih umestnih in neumestnih vprašanjih...

Hvala tudi ga. Jerneji Bogataj, ki so mi pomagali pri iskanju nekaterih težje dostopnih člankov. Seveda nismem pozabiti na prof. dr. Natašo Siard, ki so mi pomagali pri zadnjih slogovnih in drugih popravkih, prav tako lepa hvala ga, Karmeli Malinger za hiter pregled angleškega izvlečka. Iskrena hvala tudi ostalemu osebju na Rodici, ki so mi v tem prelepem času študija kakorkoli krajšali čas, me izobraževali in prenašali moje muhe in neumnosti.

Najlepša hvala staršem in cekaroma (Igor in Jani), ki so me prenašali ob vikendih, ko sem domov prihajal ležat in si kaj zmišljevati. Bom probal to nadoknaditi, obljudim.

Najtesnejši bandi se zahvaljujem za veselje še iz časov ko sem bil še manjši kot zdaj (nekje vas moram omenteti): Tom (na tem mestu prištevam še Nadjo), Jonas, Igor, Marko (Brejda), Kača ... Tomažu na tem mestu se še posebej zahvaljujem za čas in trud pri končnem oblikovanju tega dela.

Neka vrstica tudi ostaja za koračko bando, ki mi daje toliko veselja, da odločitev o vrnitvi domov ni bila težka: Petra, Sandra, Roman, Tomaž, Žrebko, Pejč, Lidija, Rado, Bojan, Primsi, Aleš, Pilot in ostali.... Bog vas živi!:)

Pa nenazadnje ne smem pozabiti na ŠIT-ovce, s katerimi upam, da se bomo v prihodnje le prebili do kakega peharja, drugače pa postajam njihov sponzor zdaj tudi jaz.

Nesmem pozabiti tudi na borce iz študijskih klopi, ker brez njih bi bilo resen na Rodice »težkovrzdrljivo«: Stojc, Gregor, Karolina, Nastja, Aleš, Direktor (Borut), Miro, Mič, Frenk, Tinkara in ostali..., kaj naj rečem: fejn je blo.

Hvala farmacevtskemu klanu (Metka, Eva, Banč, Neo in co.) in ostalim »ročnedolincem« za vse skupne prebluzjene noči po Rožni, KMŠ-ju in drugje, sploh ne bi dobro poznal kaj je maček, če vas ne bi blo.

Pa hvala lepa Klubu Ormoških študentov za pomoč pri tiskanju diplome (hvala Žiga za čas).

Hvala tudi kolektivu iz Lek-veterine iz Lipovec za vzpodbujanje ob koncu študija in pomoč ter potrpežljivost, verjamem da vam bom vrnil uslugo. Posebno zahvala za gospo Silvo, ki mi že sedaj, pa čeprav se poznamo komaj mesec dni obilo, pomaga pri čemerkoli pač prosim.

Nazadnje pa zahvala nekemu v katerega verjamem že od nekoč in zaradi katerega verjamem, da sem prilezel do sem. Hvala da me gledaš od tam zgoraj in se vsake toliko spomniš na mene.

Samo to še: **»QUISQUE SUAS SUSTINET CRUCES«** (Vsak nosi svoj križ).



## PRILOGE

Priloga A: Frekvence genotipov PrP pri različnih pasmah ovc po Sloveniji

Pasma	Frekvence genotipov PrP (v %)														
	ARR/ ARR	ARR/ AHQ	ARR/ ARH	ARR/ ARQ	AHQ/ AHQ	AHQ/ ARH	AHQ/ ARQ	ARH/ ARH	ARH/ ARQ	ARQ/ ARQ	ARR/ VRQ	AHQ/ VRQ	ARH/ VRQ	ARQ/ VRQ	VRQ/ VRQ
JS	3,5	2,6	2,9	21,2	0,8	1,0	9,2	0,7	11,0	40,0	1,1	0,4	0,5	5,0	0,2
JSR	2,8	2,6	0,2	25,4	0,8	0,1	10,7	0	1,5	48,3	1,5	0,8	0	5,1	0,1
BP	11,6	2,9	0,8	42,4	0,1	0,1	5,4	0	0,4	33,5	1,9	0	0	1,9	0,1
T	23,7	7,5	17,2	31,2	0	0	2,2	0	7,5	4,3	2,2	0	0	3,2	1,1
B	3,5	5,3	2,3	18,8	4,3	2,0	18,4	1,5	7,6	34,4	0,5	0,5	0,2	0,6	0,1
VFB	5,9	11,4	1,3	19,3	4,8	1,1	26,5	0,2	2,2	25,6	0,2	0,7	0	0,9	0
IP	13,1	4,8	0	32,8	1,1	0	7,6	0	0,2	35,6	1,3	0,5	0	2,5	0,5

JS – jezersko-solčavska; JSR – oplemenjena jezersko-solčavska; BP – belokranjska pramenka; T – teksel; B – bovška; VFB – oplemenjena bovška; IP – istrska pramenka