

Mutaciones adyacentes a los codones 136 y 171 del gen PrnP ovino afectan al protocolo diagnóstico basado en RT-PCR acoplado a sondas fluorescentes

A. Traoré*, L.J. Royo**, I. Álvarez**, I. Fernández**, J.P. Gutiérrez***, C. Rincón**, L. Pérez-Pardal**, F. Goyache**

* INERA, 04 BP 8645 Ouagadougou 04, Burkina Faso

** Área de Genética y reproducción Animal. SERIDA-Somió, C/ Camino de los Claveles 604, 33203 Gijón (Asturias)

*** Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

E-mail: fgoyache@serida.org

Resumen

Este trabajo pretende mostrar los problemas encontrados en el protocolo diagnóstico basado en RT-PCR de los codones 136, 154 y 171 del gen PrnP ovino cuando existen mutaciones en la secuencia del gen en los nucleótidos adyacentes a estas posiciones. Se han genotipado un total de 90 individuos pertenecientes a 3 razas españolas (Xalda, Rubia del Molar y Colmenareña) y 3 poblaciones ovinas de Burkina Faso: Sahel, Djallonké y Mossi. Como resultados más destacados, en las razas de Burkina Faso sólo se encontraron 3 alelos (ARQ, ARR y AHQ) con ausencia del alelo VRQ. Además, en 3 individuos el protocolo no fue capaz de identificar ninguno de los polimorfismos en los codones 136 y 171. Se secuenciaron 410 pares de bases del gen PrnP incluyendo los codones 136, 154, y 171, y se identificaron varios polimorfismos en los codones 138, 143 y 172. Estos polimorfismos afectan al resultado del protocolo diagnóstico. Se concluye que la existencia de polimorfismos en las regiones adyacentes de los codones genotipados, pueden afectar a los resultados de algunos protocolos diagnósticos, y con ello a los esquemas de selección de algunas razas ovinas basados en los genotipos del gen Prnp.

Palabras clave: Ovejas, Scrapie, África subsahariana, RT_PCR, África occidental

Summary

Adjacent mutations to ovine PrnP codons 136 and 171 affect performance of the diagnostic protocol based on RT-PCR coupled to fluorescence probes

In this work we show the problems we have found, in the performance of a diagnostic protocol for the 136, 154 and 171 codons of the PrnP ovine gene based on RT-PCR, when mutations exist in the adjacent nucleotides of these positions. A total of 90 individuals belonging to 3 Spanish (Xalda, Rubia del Molar and Colmenareña) and 3 Burkina Faso sheep breeds (Sahel, Djallonké and Mossi) were genotyped. Only 3 alleles (ARQ, ARR and AHQ) were found in the Burkinabé breeds. Diagnostic could not be carried out on codons 136 and 171 in 3 Burkinabé individuals. A total of 410 base pairs of the PrnP gene including codons 136, 154 and 171 were sequenced allowing the identification of polymorphisms on codons 138, 143 and 172. The identified polymorphisms affected diagnostic performance. Programmes using the PrnP genotype as selection criterion could also be affected.

Key words: Sheeps, Scrapie, Subsaharian Africa, RT_PCR, West África

Introducción

En el laboratorio del Área de Genética y Reproducción del SERIDA se lleva a cabo el genotipado de las variantes del gen PrnP ovino que afectan a los codones 136, 154 y 171, y participa en el ensayo colaborativo dirigido por el Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid). Este protocolo es básicamente el descrito en Van Poucke et al. (2005), al que se le ha añadido una nueva sonda para el diagnóstico de la variante K en el codon 171. Las referencias sobre las frecuencias de los polimorfismos del gen PrnP en poblaciones ovinas africanas son escasas (Serrano et al., 2007). En este trabajo vamos a presentar los resultados preliminares de aplicar el protocolo anterior en 3 poblaciones ovinas diferenciadas de Burkina Faso. Además se van a genotipar 15 individuos de las poblaciones ovinas Xalda, Rubia del Molar y Colmenareña.

En algunas poblaciones españolas y otros lugares del mediterráneo, se ha constatado la presencia del alelo ARK, no incluido en la normativa europea. En este trabajo aprovechamos para testar también la presencia de este alelo en las poblaciones analizadas.

Material y métodos

Se genotiparon 15 individuos de cada una de las razas ovinas Xalda, Rubia del Molar, Colmenareña, Djallonké, Mossi y Sahel más los correspondientes controles para cada uno de los genotipos. El protocolo utilizado para secuenciar es el descrito por Van Pocke et al. (2005), basado en RT-PCR acoplada a sondas fluorescentes, con la única modificación de que se añade la sonda 171-K (Cy5- AGAC-CAGTGGATAAGTATAGTAACCA- BHQ2), en la PCR-2. Para la amplificación y posterior secuenciación de una región de 428 pb del gen PrnP, se utilizaron los oligos 5'-GTGGAG-GCTGGGGTCAAGGTGGTAG-3' y 5' AAAGA-

GATGAGGAGGATCACAGGAC-3'. El producto PCR se purificó con Exosap(USB), y se secuenció utilizando el BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

Resultados y discusión

Los resultados de las frecuencias genéticas se muestran en la tabla 1. Cabe destacar que no se encontró ningún alelo VRQ en las razas analizadas. En las poblaciones africanas se encuentra en un porcentaje muy alto (0,8 o superior) el alelo ARQ. Otros dos alelos, AHQ y ARR, se encontraron en muy baja frecuencia. En varios individuos, el protocolo no identificó ninguna de los posibles polimorfismos, no permitiendo su diagnóstico. Para conocer el genotipo correcto, se secuenciaron dos individuos de la población Mossi y 4 individuos de la población Djallonké para un fragmento de 410 pb del gen PrnP que contiene los codones 136, 154 y 171. Se encontraron 6 polimorfismos en las secuencias de los 6 individuos, sin que ninguno afectara a los codones 136, 154 o 171. Sin embargo, dos de esos polimorfismos si afectaron a codones adyacentes (138 y 172), que se localizan en las zonas de reconocimiento de las sondas.

El gen PrnP se ha asociado a la resistencia o susceptibilidad a padecer la enfermedad de la tembladera o *scrapie* en ovino. En este trabajo se han genotipado, además de 3 razas españolas, 3 poblaciones del oeste de África, concretamente de Burkina Faso, con el protocolo utilizado rutinariamente en la raza ovina Xalda para el genotipado de los codones 136, 154 y 171.

En las poblaciones ovinas de Burkina Faso no existe selección de ningún tipo en el ganado ovino. A pesar de ello, parece existir poca variabilidad genética para el gen PrnP y no se ha detectado la presencia del alelo VRQ (tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias alélicas determinadas a partir de las mutaciones encontradas en los codones 136, 154 y 171 del gen PrnP ovino en 3 poblaciones españolas: Xalda, Rubia del Molar y Colmenareña y 3 de Burkina Faso: Sahel, Djallonké y Mossi

Table 1. Allelic frequencies obtained from the mutations identified on codons 136, 154 and 171 of the ovine PrnP gene in 3 spanish sheep populations: Xalda, Rubia del Molar, Comenareña and 3 from Burkina Faso: Sahel, Djallonké and Mossi

	ARR	ARQ	AHQ	ARH	_RQ	AR_
Sahel	3 0,1	24 0,8	3 0,1	0 0	0 0	0 0
Mossi	1 0,03	25 0,83	2 0,07	0 0	2 0,07	0 0,00
Djallonké	0 0	24 0,8	2 0,07	0 0	0 0,00	4 0,13
Xalda	11 0,37	18 0,6	0 0	1 0,03	0 0	0 0
Rubia del Molar	13 0,43	16 0,53	0 0	1 0,04	0 0	0 0
Colmenareña	10 0,33	17 0,57	3 0,1	0 0	0 0	0 0

Un individuo de la población Mossi, resultaba negativo a las dos sondas del codon 136. Su secuenciación evidenció que se trataba de un individuo 136-A, con una mutación silenciosa (T/C) que afectaba al tercer nucleótido del codon 138. Esta mutación coincide en la secuencia de reconocimiento de las dos sondas utilizadas en el diagnóstico, no permitiendo su hibridación, resultando en un fallo en el diagnóstico. En 3 individuos de la población Djallonké ocurría un caso semejante; en uno de ellos no se obtenía resultado diagnóstico para el codon 171, y en dos de ellos sólo se diagnosticaba el genotipo de un alelo. Tras la secuenciación, se evidenció una mutación (G/T) en el primer nucleótido del codon 172 (Y172D), descrita anteriormente por Acin *et al.* (2004) en ovejas de las razas Rasa Aragonesa, y recientemente también en poblaciones de ovejas de Maruecos (Serrano *et al.*, 2007), que igualmente afectaba a la secuencia de reconocimiento de las sondas del codon 171.

Por otro lado cabe destacar que no se evidenció la presencia del alelo ARK en ninguna de las poblaciones analizadas, si bien el número de individuos analizados es muy bajo.

La variabilidad del gen PrnP ovino es muy alta y su conocimiento es creciente con el análisis de las secuencias de nuevas poblaciones de ovejas. Se han descrito nuevos polimorfismos en los codones señalados como importantes para la susceptibilidad/resistencia a las encefalopatías espongiiformes transmisibles (Acutis *et al.*, 2004; Billinis *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2006), de los que se desconoce su importancia clínica. Estos polimorfismos además están presentes en cierta frecuencia en las poblaciones ovinas españolas, lo que interfiere en algunos de los protocolos que se viene usando rutinariamente en los laboratorios diagnósticos. A esto hay que añadir los problemas que hemos encontrado debidas a mutaciones localizadas en regiones adyacentes a los codones señalados, y

que también se han identificado en poblaciones españolas. Estas interferencias en los protocolos diagnósticos rutinarios, puede provocar problemas en la aplicación de los esquemas obligatorios de selección de individuos atendiendo al genotipo del gen PrnP, sobre todo en poblaciones en riesgo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto INIA-RZ2004-00007-C02. A. Traore disfruta de una beca financiada por la *International Atomic Energy Agency*, No. BKF/06023. Agradecemos la colaboración de Concepción López (Laboratorio Central de Veterinaria de Algete, Madrid).

Bibliografía

Acín C, Martín-Burriel I, Goldmann W, Lyahyai J, Monzón M, Bolea R, Smith A, Rodellar C, Badiola JJ, Zaragoza P, 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J. Gen. Virol.*, 85, 2103–2110.

Acutis PL, Sbaiz L, Verburg F, Riina MV, Ru G, Moda G, Caramelli M, Bossers A, 2004. Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. *J Gen Virol.*, 85, 3165-72.

Álvarez L, Arranz JJ, San Primitivo F, 2006. Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep. *J Anim. Sci.*, 84, 259-65.

Billinis C, Psychas V, Leontides L, Spyrou V, Argroudis S, Vlemmas I, Leontides S, Sklaviadis T, Papadopoulos O, 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *J Gen Virol.*, 85, 547-54.

Serrano C, Martín-Burriel I, Lyahyai J, Monzón M, El Hamidi M, Acín C, Badiola JJ, Tligui N, Zaragoza P, 2007. Polymorphisms of the PRNP gene in Moroccan sheep breeds. *Vet. Rec.*, 161, 524-525

Van Poucke M, Vandesompele J, Mattheeuws M, Van Zeveren A, Peelman LJ, 2005. A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep. *BMC Infect. Dis.*, 5, 13.

(Aceptado para publicación el 28 de abril de 2008)