

LIETUVOS JUODGALVIŲ IR LIETUVOS VIETINIŲ ŠIURKŠČIAVILNIŲ AVIŲ VEISLIŲ PrP GENO POLIMORFIZMAS

Rasa Volskienė, Ilona Miceikienė

Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181, Kaunas

Santrauka. Tyrimams pasirinktos Lietuvos juodgalvės ir Lietuvos vietinės šiuurkščiaivilnės avys. Sekvenavimo metodu ištirtas 56 individų prioninio baltymo (PrP) geno polimorfizmas. Avių PrP geno trečio egzono 939 bp fragmentai amplifikuoti ir išanalizuoti tiesioginio sekvenavimo būdu. Išaiškintas 136, 154 ir 171 kodonuose esantis polimorfizmas ir aptikti trys skirtingi haplotipai (ARR, ARQ, AHQ). Nustačius 136, 154 ir 171 kodonų polimorfizmą, tirtose veislėse ARR (atsparumo skrepi ligai) alelis aptiktas heterozigotinės ir homozigotinės būsenos. Labai didelę susirgimo riziką lemiantis VRQ alelis aptiktas nebuvo.

Raktažodžiai: PrP genas, alelis, kodonas, genotipas, polimorfizmas, skrepi.

PRION PROTEIN GENE POLYMORPHISMS IN LITHUANIAN COARSEWOOL NATIVE AND LITHUANIAN BLACKFACE SHEEP BREEDS

Rasa Volskienė, Ilona Miceikienė

Department of Animal Breeding and Genetics, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės 18, LT-4781 Kaunas, Lithuania

Summary. Fifty-six sheep of Lithuanian coarsewool native and Lithuanian blackface breeds were sequence analyzed for polymorphisms in the prion protein (PrP) gene. Genotype and allele frequencies of polymorphisms in PrP known to confer resistance to scrapie, a fatal neurodegenerative disease of sheep. A 939 bp fragment of exon 3 from ovine PrP gene was amplified by PCR and analyzed by direct sequencing. Double heterozygous genotypes were further verified by PCR cloning and sequence analysis. Known polymorphisms at codons 136, 154 and 171 were observed, and three different haplotypes (ARR, ARQ, AHQ) were determined. Based on the polymorphisms observed at codons 136, 154 and 171, sheep population of Lithuanian coarsewool native and Lithuanian blackface breeds showed the resistant ARR allele in different frequencies. High risk VRQ allele did not occurred.

Keywords: PrP gene, scrapie, polymorphisms, sheep.

Įvadas. Avių skrepi liga Jungtinėje Karalystėje aprašyta jau prieš 270 metų. XVIII amžiuje Didžiojoje Britanijoje kilusios epidemijos metu krito ištisos gyvulių bandos (Parry, 1962).

Skrepi – lėtai progresuojanti, pažeidžianti centrinę nervų sistemą mirtina infekcinė liga. Jai būdingas ilgas inkubacinis periodas (2–7 m.) ir lėti degeneraciniai pokyčiai centrinėje nervų sistemoje. Ligos požymiai – padidėjęs gyvulio jautrumas, judesių koordinacijos sutrikimai, kūno drebulys, smarkus kūno niežėjimas, vilnos slinkimas, organizmo išsekimas, paralyžius, gaišimas (Goldmann et al., 1994).

Skrepi priskiriama transmisinių spongiforminių encefalopatijų (TSE) grupei. TSE – tai prioninės ligos, kurioms priklauso galvijų spongiforminė encefalopatija (BSE), žmonių Creutzfeldt-Jakobo liga (CJD), Gerstmanno-Sträusslerio-Scheinkerio sindromas (GSS), kuru (Acutus et al., 2004).

Prionai – 1982 metais mokslininko Stenlio Prusinerio atrasta nauja infekcijos sukėlėjų klasė. Jie yra unikalūs, nesudėtingi, mažesni už virusus, labai atsparūs karščiui baltymai, juose nėra nukleininė rūgščių. Tuo prionai skiriasi nuo visų žinomų mikroorganizmų. Prioninius susirgimus sukelia prioniniai baltymai, verčiantys normalius baltymus keisti formą ir pradėti grandininę reakciją, sukeliančią mirtinus pokyčius organizmuose. Prioniniams susirgimams būdingas normalaus prioninio

baltymo (PrP^C) kitimas ir proteazei atsparaus prioninio baltymo (PrP^{Sc}) kaupimasis infekuoto gyvulio smegenyse (Bossers et al., 1996). Infekuoti prionai yra netirpūs, rezistentiški proteinazei, fiziniam bei cheminiam poveikiui, įvairiems detergentams ir radiacijai. Verdant jie išlieka gyvybingi 30–60 min., išdžiovinoti – 2 metus. Ekstremaliomis sąlygomis iš visų gyvūnų organizmų prionai žūva paskutiniai. Už prioninio baltymo teorijos pagrindimą 1997 metais Stenlis Prusineris buvo apdovanotas Nobelio premija. Baltymas, sukeliantis skrepi ligą, buvo pavadintas PrP^{Sc} skrepi baltymu.

Avių PrP genas, sudarytas iš trijų egzonų, aptinkamas 13 chromosomoje. Įrodyta, kad avių PrP geno trečio egzono 136, 154 ir 171 kodonų genotipai tvirtai susiję su jautrumu skrepi ligai (Goldmann et al., 1990; 1994; Belt et al., 1995; Clousard et al., 1995; Bossers et al., 1996; Hunter et al. 1994; 1997; 2000). Pasaulio avių populiacijoje nustatyti penki dažniausiai pasitaikantys haplotipai: ARR, AHQ, ARH, ARQ ir VRQ (Belt et al., 1995) ir trys retai pasitaikantys: VRR, AHR, ARK (Kutzer et al., 2002; Tkacikova et al., 2003; Guo et al., 2003). Įvairiais tyrimo metodais įrodyta, kad avys, PrP gene turinčios homozigotinį ARR alelį, genetiškai yra visiškai atsparios skrepi infekcijai. Tuo tarpu gyvuliai, turintys homozigotinį VRQ alelį, – visiškai neatsparūs skrepi infekcijai ir priklauso didelės rizikos grupei (Heggebo et al., 2002; Baylis et al., 2004; Moum et al.,

2005). Pastarąjį dešimtmetį kai kuriose Europos šalyse pradėtos valstybinės ligai atsparių bandų kūrimo programos, selekcijai panaudojant tik ARR alelį turinčias avis (Schreuder et al., 1997; Kao et al., 2001). Šiuo metu visose Europos Sąjungos šalyse siekiama įgyvendinti privalomas TSE atsparių avių veisimo programas (Komisija 2003/100/EB).

Medžiagos ir metodai. Tyrimams pasirinktos Lietuvos juodgalvių ir Lietuvos vietinių šurkščiavilnių veislių avys. Ištirti 56 negiminingi, sveiki, 10 metų ir vyresni individai iš atsitiktinių šešių avių bandų.

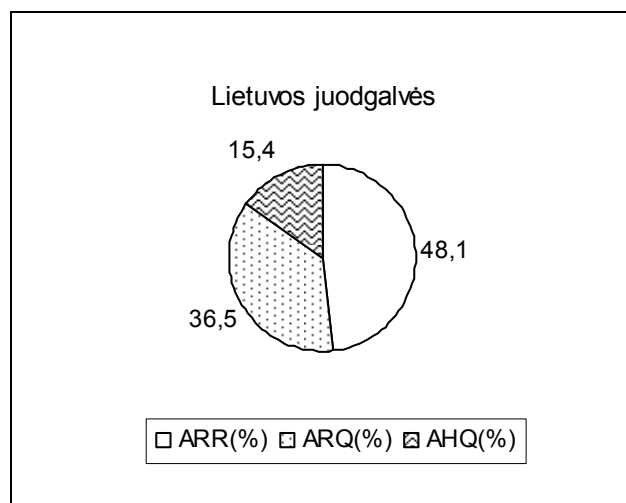
DNR skyrimui taikyta standartinė fenolinė-chloroforminė DNR skyrimo iš kraujo metodika (Miller et al., 1988). Amplifikacijai naudoti PrP_{3F} 5'-AAA AGC CAC ATA GGC AGT TG-3' ir PrP_{4R} 5'-CAG CAT CTC ATG TCT GCT TG-3' pradmenys (genų banko katalogo Nr. M31313). Iš avių PrP geno trečio egzono amplifikuotas 939 bp ilgio prioninio baltymo geno fragmentas. PGR atlikti vienam mėginiui naudota: 15 µl 1 proc. DMSO, po 6 µM pradmenų, 100 µM dNTP, 0,5 U Tag polimerazės (Q-Biogene, Heidelberg, Vokietija), 30 ng genominės DNR. PGR atlikta termocikleryje PTC-100 pagal programą: pirminė denatūracija 94°C – 5 min ir 32 ciklai: 94°C – 45 s (denatūracija), 58°C – 45 s (oligonukleotidų prisijungimas), 72°C – 80 s (DNR grandinės sintezė) (MJ Research, Hess. Oldendorf, Vokietija). DNR sekai nustatyti naudotas fluorescencinis sekvenavimo paketas su 7-deaza-dGTP (Amersham farmacija Biotech, Freiburg, Vokietija). Imta: 100 µM ddNTP, 4 µM fluorescuojančių 5'-IRD700 žymenų pradmenų (PrP3/4_S700 5'-AAG GTG GTA GCC ACA GTC AG-3'), 1 proc. DMSO ir 1,5 µl anksčiau gauto PGR produkto. PGR atliekama tokia tvarka: denatūracija 94°C – 3 min ir 32 ciklai: 94°C – 45 s, 57°C – 45 s, 72°C – 45 s. Sekvenavimo reakcija atliekama LI-COR 4200 DNA sekvenatoriumi (LICOR, Bad Homburg, Vokietija) 6 proc. denatūruotame poliakrilamidiniame gelyje. Sekvenatoriaus 4.2 programinė įranga (Gene Codes, Ann Arbor, JAV) pritaikyta pavienių nukleotidų polimorfizmui identifikuoti. PrP geno haplotipams patvirtinti heterozigotinių gyvulių PGR produktai dauginami naudojant „pDrive Cloning Vector QIAGEN“ PGR paketą (Qiagen, Hilden, Vokietija).

Tyrimų rezultatai. Tyrimo metu nustatytas Lietuvos juodgalvių ir Lietuvos vietinių šurkščiavilnių avių veislių trijų PrP geno kodonų – 136, 154 ir 171 polimorfizmas. Abiejų tirtų avių veislių 171 kodone rasti gliutamino ir arginino aleliai. Galimi histidino ar lizino aleliai šiame kodone nebuvo aptikti. 154 kodone aptikti abu galimi aleliai – argininas ir histidinas. 136 kodonas nebuvo polimorfiškas. Jame aptiktas tik pageidaujamas alanino alelis.

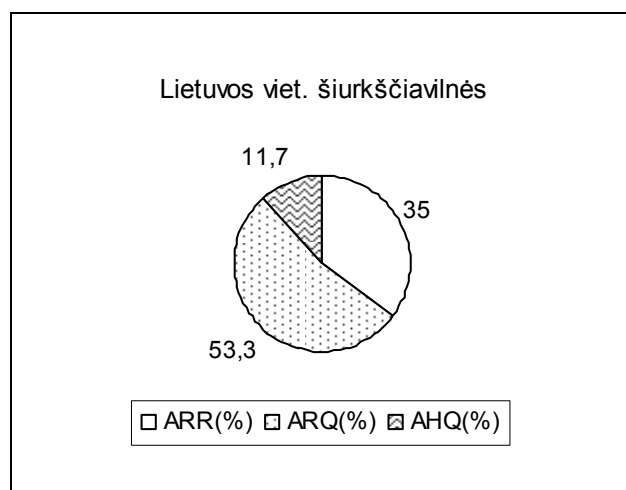
PrP geno haplotipų pasiskirstymas Lietuvos vietinių šurkščiavilnių ir Lietuvos juodgalvių avių veislėse pateiktas 1 ir 2 pav.

Tarp tirtų individų skirtingu dažniu aptikti trys haplotipai: ARR, ARQ ir AHQ. Pageidaujamas ARR haplotipas Lietuvos juodgalvių avių tarpe sudarė 48,1 proc., o tarp Lietuvos vietinių šurkščiavilnių – 35,5 proc. Avių populiacijoje dažniausiai pasitaikantis ARQ

haplotipas Lietuvos vietinių šurkščiavilnių tarpe sudarė 53,3 proc., o Lietuvos juodgalvių avių – 36,5 proc. AHQ haplotipas Lietuvos juodgalvių avių veislėje sudarė 15,4 proc., o Lietuvos vietinių šurkščiavilnių – 11,7 proc.



1 pav. PrP geno haplotipų pasiskirstymas Lietuvos juodgalvių avių veislėje



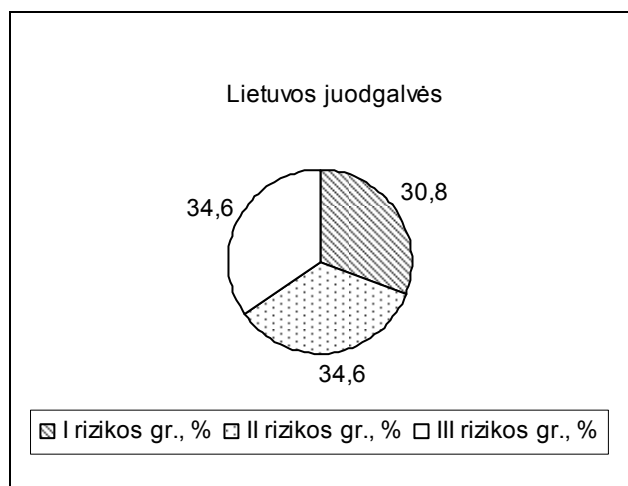
2 pav. PrP geno haplotipų pasiskirstymas Lietuvos vietinių šurkščiavilnių avių veislėje

Tirtose Lietuvos juodgalvių ir Lietuvos vietinių šurkščiavilnių avių veislėse skirtingu dažniu aptikti penki PrP geno genotipai: ARR/ARR, ARR/ARQ, ARR/AHQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARQ. Lyginant su kitų mokslininkų duomenimis, Lietuvos juodgalvių ir Lietuvos vietinių šurkščiavilnių avių veislėse rastas mažesnis polimorfizmas nei texel avių veislėje, kurioje aptinkama 17 genotipų, pieninėje fryzų veislėje – 7 (Kutzer et al., 2002), Mongolijos avių veislėse – 16 (Gombojav et al., 2003), Slovakijos – 9 skirtingi genotipai (Holko et al., 2005).

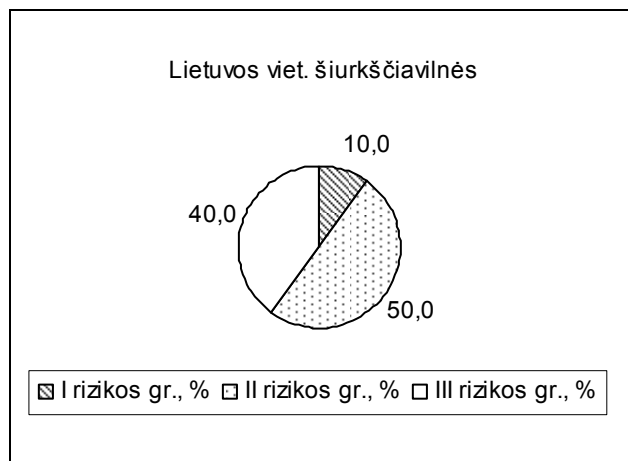
Didžiosios Britanijos nacionalinio skrepi plano nustatytos PrP geno genotipų rizikos grupės (DEFRA, 2004) pateiktos lentelėje.

Lentelė. PrP geno genotipų rizikos grupės (DEFRA, 2004)

Rizikos grupė	Avių atsparumas/jautrumas skrepi infekcijai	Genotipai
1	Visiškai atsparios	ARR/ARR
2	Atsparios	ARR/AHQ, ARR/ARH, ARR/ARQ
3	Mažai atsparios	AHQ/AHQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, ARQ/ARQ
4	Jautrios	ARQ/VRQ
5	Labai jautrios	VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/ARH, VRQ/AHQ



3 pav. Lietuvos juodgalvių veislės avių PrP geno genotipų pasiskirstymas pagal rizikos grupes



4 pav. Lietuvos vietinių šiuurkščiavilnių veislės avių PrP geno genotipų pasiskirstymas pagal rizikos grupes

Lietuvos juodgalvių ir Lietuvos vietinių šiuurkščiavilnių avių veislių PrP geno genotipų pasiskirstymas pagal rizikos grupes pateiktas 3 ir 4 pav.

Pagal tyrimo metu aptiktus PrP geno genotipus Lietuvos juodgalvės ir Lietuvos vietinės šiuurkščiavilnės avys priskiriamos trims rizikos grupėms. Didžiausią Lietuvos vietinių šiuurkščiavilnių veislės avių dalį sudarė gyvuliai, priklausantys antrai rizikos grupei (50 proc.). Šios veislės pirmai rizikos grupei priklausančių gyvulių rasta 10 proc. Likusi bandos dalis (40 proc.) priskiriama trečiai rizikos grupei. Lietuvos juodgalvių veislės avių pirmai rizikos grupei priskiriamų gyvulių yra 30,8 proc., antrai – 34,6 proc., trečiai – taip pat 34,6 proc. Avių, priklausančių ketvirtai ir penktai rizikos grupėms, tarp tiriamųjų nepasitaikė.

Aptarimas ir išvados. Nors Lietuvoje niekada nebuvo užregistruota skrepi susirgimų, intensyvios skrepi priežiūros programos turi būti įgyvendinamos jau šiandien. Kuriant atsparių skrepi ligai avių veisimo programas, pasaulyje siekiama veisti tik ARR/ARR genotipą turinčius gyvulius, eliminuoti VRQ alelio nešiotojus. PrP geno 136 kodono mutacijos parodo didžiausią avių jautrumą skrepi ligai. Lietuviškose avių veislėse mutacijų šiame kodone nerasta, todėl ir gyvulių, turinčių VRQ alelį, neaptikta. Tačiau populiacijose, kuriose VRQ alelis neaptiktas arba jis aptinkamas labai retai, didelį susirūpinimą turėtų kelti ARQ alelį turintys gyvuliai (Cloucard et al., 1995; Bossers et al., 1996; Drögemüller et al., 2001). Jungtinėje Karalystėje, tiriant skrepi infekuotų avių ligos inkubacinį periodą tariamos epidemijos atveju, nustatyta, kad jautrumas skrepi infekcijai glaudžiai susijęs su gliutaminu (Q) PrP geno 171 kodone. Avių, kurių 171 kodone gliutaminas yra heterozigotinės (Q(R/H)) būsenos, inkubacinis ligos periodas ilgesnis trejais metais negu avių, kurių 171 kodone gliutaminas aptinkamas homozigotinės (QQ) būsenos (Kao et al., 2002). Italijoje tirtos skrepi liga sergančios avys buvo ARQ/ARQ, ARQ/AHQ ir ARQ/VRQ genotipo (Vascellari et al., 2005). Sergančios skrepi Slovakijos avys taip pat buvo ARQ/ARQ genotipo (Matuskova et al., 2003).

Mūsų tyrimų duomenys gali būti pradžia naujų Lietuvos avių veislių veisimo programų. Visišką atsparumą infekcijai suteikiantis ARR/ARR genotipas aptiktas ir Lietuvos juodgalvių, ir Lietuvos vietinių šiuurkščiavilnių avių veislėse. Per 60 proc. tirtų avių turi ARR alelį. Aukštas ARR alelių dažnis, kai kuriose veislėse, aptinkamas įvairiose pasaulio šalyse – JAV (Desilva et al., 2003), Slovakijoje (Tkacikova et al., 2003), Belgijoje (Roles et al., 2004), Kinijoje (Zhang et al., 2004). Žemas ARR/ARR ir predominantinis ARQ/ARQ genotipų dažnis Lietuvos vietinių šiuurkščiavilnių veislėje sutampa su kitų Europos šalių vietinių veislių PrP geno genotipų tyrimų rezultatais (Sipos et al., 2002; Drögemüller et al., 2004; Holko et al., 2005).

Literatūra

1. Acutis P. L., Sbaiz L., Verburg F., Riina M. V., Ru G., Moda G., Caramelli M., Bossers A. Low frequency of the scrapie resistance-

- associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. 2004. *Gen Virol.* 85. P. 3165–3172.
2. Baylis M., Chihota C., Stevenson E., Goldmann W., Smith A., Sivam K., Tongue S., Gravenor M. B. Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *Journal of General Virology.* 2004. 85. P. 547–554.
 3. Belt P. B., Muileman I. H., Schreuder B. E. C., Bos de Ruijter J., Gielkens A. L. J., Smits M. A. Identification of 5 allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology.* 1995. 76. P. 509–517.
 4. Bossers A., Schreuder B. E., Muileman I. H., Belt P. B., Smits M. A. PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. 1996. *J. Gen. Virol.* 77. P. 2669–2673.
 5. Clousard C., Beaudry P., Elsen J. M., Milan D., Dussaucy M., Bouneau C., Schelcher F., Chatelain J., Launay J. M., Laplanche J. L. Different allelic effects of the codon-136 and codon-171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie. 1995. *J. Gen. Virol.* 7. P. 2097–2101.
 6. Commission (2003/100/EC) Decision of 13 February 2003 laying down minimum requirements for the establishment of breeding programmes for resistance to transmissible spongiform encephalopathies in sheep. *Official Journal L 041. 14/02/2003.* P. 0041–0045.
 7. DEFRA (2004) The National Scrapie Plan for Great Britain. Žiūrėta 2006.01.18. Internete: www.defra.gov.uk/nsp.
 8. Desilva U., Guo X., Kupfer D. M., Fernando S. C., Pillai A. T. V., Najjar F. Z., So S., Fitch G. Q., Roe B. A. Allelic variants of ovine prion protein gene (PRPN) in Oklahoma sheep. 2003. *Cytogenetic and Genome Research.* 102. P. 89–94.
 9. Drögemüller C., Leeb T., Distl O. PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *Veterinary Record.* 2001. 149. P. 349–352.
 10. Drögemüller C., De Vries F., Hamann H., Leeb T., Distl O. Breeding German sheep for resistance to scrapie. 2004. *Veterinary Record.* 154. P. 257–260.
 11. Elsen J. M., Amigues Y., Schelcher F., Ducrocq V., Andreoletti O., Eycheenne F., Tien Khang J. V., Poivey J. P., Lantier F., Laplanche J. L. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. 1999. *Archives of Virology.* 3. P. 431–445.
 12. Foster J. D., Parnham D. W., Hunter N., Bruce M. *Gen. Virology.* 2001. 82. P. 2319.
 13. Goldmann W., Hunter N., Foster J., Salbaum J. M., Beyreuther K., Hope J. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. 1990. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* 87. P. 2476–2480.
 14. Goldmann W., Hunter N., Smith G., Foster J., Hope J. PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. 1994. *Journal of General Virology.* 75. P. 989–995.
 15. Gombojav A., Ishiguro N., Horiushi M., Serjmyadag D., Byambaa B., Shinagawa M. Amino Acid Polymorphisms of PrP Gene in Mongolian Sheep. 2003. *Journal of Veterinary Medical Science.* 65. P. 75–81.
 16. Guo X., Kupfer D. M., Fitch G. Q., Roe B. A., Desilva U. Identification of novel lysine-171 allele in the ovine protein (PRNP) gene. 2003. *Animal Genetics.* 34. P. 302–318.
 17. Heggebo R., Press C. M., Gunnes G., Gonzalez L., Jeffrey M. Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. 2002. *Journal of General Virology.* 83. P. 479–489.
 18. Holko I., Novackova A., Holkova T., Kmet V. PrP genotyping of sheep breeds in Slovakia. 2005. *Veterinary Record.* 157. P. 628–630.
 19. Hunter N., Goldmann W., Smith G., Hope J. The association of a codon-136 PrP gene variant with the occurrence of natural scrapie. 1994. *Archives of Virology.* 137. P. 171–177.
 20. Hunter N., Foster J., Goldmann W., Stear M. J., Hope J., Bostock C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. 1996. *Arch. Virol.* 141. P. 809–824.
 21. Hunter N., Goldmann W., Foster J. D., Cairns D., Smith G. Natural scrapie and PrP genotype: case-control studies in British sheep. 1997. *Veterinary Record.* 141. P. 137–140.
 22. Hunter N., Goldmann W., Marshall E., O'Neill G. Sheep and goats natural and experimental TSE and factors influencing incidence of disease. 2000. *Virol. Suppl.* 16. P. 181–188.
 23. Kao R. R., Gravenor M. B., McLean A. R. Modelling the national scrapie eradication programme in the UK. 2001. *Mathematical Biosciences.* 174. P. 61–76.
 24. Kao R. R., Gravenor M. B., Baylis M., Bostock C. The potential size and duration of an epidemic of bovine spongiform encephalopathy in British sheep. 2002. *Science.* Washington. 11. P. 332–335.
 25. Kutzer T., Pfeiffer I., Brenig B. Identification of new allelic variants in the ovine prion protein (PrP) gene. 2002. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 119. P. 201–208.
 26. Matuskova M., Csokova N., Filipcik P., Hanusovska E., Bires J., Cabadaj R., Kontsek P., Novak M. First confirmed sheep scrapie with A136 R154 Q171 genotype in Slovakia. 2003. *Acta Virologica.* 47. P. 195–198.
 27. Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. 1988. *Nucleic Acids Research.* 16. P. 1215.
 28. Moum T., Olsaker I., Hopp P., Moldal T., Valheim M., Benestad S. L. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie. 2005. *Journal of General Virology.* P. 86. 231–235.
 29. Lühken G., Buschmann A., Groschup M. H., Erhardt G. Prion protein allele A₁₃₆H₁₅₄Q₁₇₁ is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. 2004. *Archives of Virology.* 8. P. 157–158.
 30. Parry H. B. Scrapie: a transmissible and hereditary disease in sheep. 1962. *Heredity.* 17. P. 75–105.
 31. Roles S., Renard C., DE Bosschere H., Geeroms R., Poucke M., Peelman L., Vanopdenbosch E. Dedection of polymorphisms in the prion protein gene in the Belgian sheep population. 2004. *Veterinary quarterly.* 26. P. 3–11.
 32. Schreuder B. E. C., van Keulen L. J. M., Smits M. A., Langeveld J. P. M., Stegeman J. A. Control of scrapie eventually possible. 1997. *Veterinary Quarterly.* 19. P. 105–113.
 33. Sipos W., Kraus M., Schmoll F., Achmann R., Baumgartner, W. PrP genotyping of Austrian sheep breeds. 2002. *Veterinary Medicine.* 49. P. 415–418.
 34. Tkacikova L., Hanusovska E., Novak M., Arvayova M., Mikula I. The PrP genotype of sheep of the improved Valachian breed. 2003. *Folia Microbiology. Praha.* 48. P. 269–276.
 35. Vascellari M., Aufiero G. M., Nonno R., Agrimi U., Vaccari G., Basilicata L., Falcaro C., Mancin M., Marcon S., Mutinelli F. Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. 2005. *Archives of Virology.* 10. P. 1959–1976.
 36. Zhang L., Li N., Fan B., Fang M., Xu W. PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. 2004. *Animal Genetics.* 35. P. 457–461.
 37. Zsolani A., Anton I., Kuhn C., Fesus L. Detection of single polymorphisms coding for three ovine prion protein variants by primer extension assay and capillary electrophoresis. 2003. *Electrophoresis.* 24. P. 634–638.