



PÄRILIKU SKREIPIRESISTENTSUSE DÜNAAMIKA EESTI LAMBATÕUGUDEL

THE DYNAMICS OF HEREDITARY SCRAPIE RESISTANCE IN ESTONIAN SHEEP BREEDS

Erkki Sild, Sirje Värv, Haldja Viinalass

*Eesti Maaülikool, veterinaarmeditsiini ja loomakasvatuse instituut, tõuaretuse ja biotehnoloogia õppetool,
Fr. R. Kreutzwaldi 1, 51006 Tartu*

Saabunud: 18.04.2018
Received:
Aktsepteeritud: 28.05.2018
Accepted:
Avaldatud veebis: 04.06.2018
Published online:
Vastutav autor: Erkki Sild
Corresponding author:
E-mail: erkki.sild@emu.ee
Phone: +372 731 3467

Keywords: scrapie risk, scrapie eradication program, Estonian sheep breeds, PRNP allele frequency.

doi: 10.15159/jas.18.04

ABSTRACT. A total of 2,411 sheep from the Estonian Whitehead (N = 1301) and Estonian Blackhead (N = 1110) breeds were genotyped for markers of scrapie risk in the period 2005–2017. Sanger sequencing was used to identify nucleotide substitutions in the PRNP gene at codons 136, 141, 154 and 171 to determine corresponding amino acids in prion protein. Sheep were divided into 13 groups according to their birth year to assess the temporal changes on the genetic profile of the studied population. Seven different alleles and 16 different genotypes (12 for Estonian Blackhead and 16 for Estonian Whitehead) were identified. In the birth year group 2007 (two years after the introduction of a scrapie eradication programme) a statistically significant change in the allele ALRR frequencies was found. The selective breeding for allele ALRR (the scrapie resistant marker) increased in frequency from 0.40 to 0.70 during the period 2006–2017. Significant declines in allele frequencies ALRQ (0.40–0.20) and ALRH (0.13–0.03) were found. The frequency of the most susceptible to scrapie allele (VLRQ) was low (< 0.03), and the decrease of the frequency during the program was insignificant. Both sheep breeds showed statistically significant changes in allele, genotype and risk group frequencies between the birth year groups before the introduction of the scrapie eradication programme and at its end. The effect on genetic profile in terms of changed allele frequencies was statistically more significant in the Estonian Whitehead sheep ($p < 0.001$) than in the Estonian Blackhead sheep ($p < 0.05$).

© 2018 Akadeemiline Põllumajanduse Selts. Kõik õigused kaitstud. 2018 Estonian Academic Agricultural Society. All rights reserved.

Sissejuhatus

Alates 2004. aastast rakendatakse kõigis Euroopa Liidu liikmesriikides ühist strateegiat lammaste transmissiivsete spongiossete entsefalopaatiate (TSE) resistentsuse saavutamiseks (Euroopa Komisjoni otsus 2003/100/EÜ). Eestis on kehtestatud lammastele prionvalgu geeni *PRNP* geenitesti läbiviimiseks kord Riikliku loomatauditõrje programmi ja rakendusmeetmete alusel. Geneetilistele markeritele põhinev lammaste skreipi haigestumise riski vähendav programm sai Eestile kohustuslikuks 1. mail 2004. Eestis kasvatatavast ligi 90 000 lambast on eesti tumeda- ja valgepealisi tõulambaid alla 5000 (ELKL, 2017; ETLA, 2016), lisaks on tunnustatud kihnu maalambad (alates 2016) ning uute imporditud tõugudena dorper ja lleyini

(alates 2018), keda on lisaks teistele parandajatõugudele imporditud Eestisse alates 2009. ja 2012. aastast.

Skreipi on surmaga lõppev neurodegeneratiivne haigus lammastel ja kitsedel. Skreipi kuulub TSE-de gruppi, kuhu kuuluvad ka veiste spongiosne entsefalopaatia (inglisekeelne lühend BSA; "hullu lehma tõbi") ja inimeste Creutzfeldt-Jakobi tõbi (inglisekeelne lühend CJD). TSE haiguste teke on seotud raku prionvalgu isovormiga. Esimest korda diagnoositi skreipit ca 250 aastat tagasi Inglismaal (Prusiner, 1998).

2016. aastal diagnoositi skreipit kahekümnes EL-i liikmesriigis 685 juhul. Klassikalist vormi diagnoositi üheksas EL-i liikmesriigis ja Islandil ning atüüpilise skreipi vormi 18 liikmesriigis ja Norras. Üle 80% skreipi juhtudest registreeriti Kreekas, Hispaanias, Itaalias ja Rumeenias. Atüüpilise skreipi juhtudest

(122) enim registreeriti Portugalis, Ungaris, Ühendkuningriigis, Hispaanias ja Norras. Haiguse esinemine oli klassikalise skreipi puhul 97,2% juhtudest ja atüüpilise skreipi puhul 57,6% seotud riskigruppidega R3, R4 või R5 (EFSA, 2017). Eestis on seniajani diagnoositud kaks atüüpilise skreipi juhtu, üks 2010. ja teine 2011. aastal (EFSA, 2016).

Hollandi (aastatel 2003–2008) nakatunud karjade andmete põhjal läbi viidud uuringu kohaselt oli lammaste vastuvõtlikkus skreipile väga erinev – sõltuvalt prioonivalgu genotüübist erines nakatunute arv tuhande lamba kohta 0–368,4 (Hagenaars jt, 2010) ja oli kooskõlas genotüübipõhiselt sätestatud riskirühmadega. Pikaajalise selektsiooniprogrammiga on oluliselt muudetud karjade geneetilist profiili ja oodatud mõjuna on saavutatud skreipiresistentsuse tõus. Samal ajal on eksperimentaalsed võrdlusuuringud erinevast keskkonnast (ja tõust) pärit, kuid sama genotüübiga lammaste puhul olnud erineva kliinilise avaldumisega, mis viitab sellele, et teistest tõugudest sissetoodava materjali puhul ei pruugi karjade resistentsuse ja genotüübi vaheline seos endisel kujul kehtida (Houston jt, 2015).

Prioonvalk on signaali ülekandes osalev kesknärvisüsteemi glükoproteiinvalk, mis asub rakumembraani välispinnal. TSE tekitajaks on defektne proteaasidest resistentne prioonivalgu vorm, mille tõttu lüüsoomidesse kuhjuvad lagundamata valgud (Diener jt, 1982). Defektne valk seondub tervega ja muudab selle sekundaarstruktuuri, st α -heeliksiks muudetakse β -lehtedeks. Selle tagajärjel hakkavad defektsed valgud kuhjuma lüüsoomi, kuni see lõhkeb. See omakorda põhjustab raku surma ning aju muutub poorseks (käsniaks). Mida poorsemaks aju muutub, seda raskemaks muutuvad haigusnähud – lambal kaob koordinatsioon, lammast hakkab ennast kratsima (siit ka eestikeelne nimi – kratsimistõbi), halvaneb nägemine, esineb lihaste värinat ja halvatust. Haigus lõpeb surmaga.

Prioonivalgu sünteesi määrav geen *PRNP* asub 13. kromosoomis millelt kodeeritakse ja protsessitakse 209-aminohappeline valk. *PRNP*-geenis on avastatud üle 20 polümorfismi, millest skreipile vastuvõtlikkusega on seotud peptiidahela aminohapete positsioonid 136, 141, 154 ja 171. Teadaolevad mutatsioonid on järgmised: koodonis 136 GCC → GTC ja ACC (põhjustavad peptiidahelas aminohappealaniini asenduse valiini või treoniiniga), koodonis 141 CTT → TTT (leutsiin → fenüülalaniin), koodonis 154 CGT → CAT (arginiin → histidiin), koodonis 171 CGG → CAG, CAT või AAG (arginiin → glutamiin, histidiin või lüsiin). Prioonivalgu haplotüüp/alleel esitatakse sõltuvalt geenitesti tulemusest, tähistades järjest vastavad aminohapped positsioonides 136, 141, 154 ja 171. Näiteks kui koodoni 136 nukleotiidide järjestus on GCC, on prioonivalgu haplotüübi esimene aminohapealaniin (A), teine tähistatakse 141. koodoni nukleotiidide järjestuse järgi (TTT kodeerib fenüülalaniini F), kolmas 154. koodoni järgi (CGT kodeerib arginiini R) ja neljandana 171. koodoni järgi (CAG kodeerib glutamiini Q). Seega on neljatäheline variant AFRQ üks prioonivalgu haplotüüpidest (kasutatakse ka

terminit alleel) ja tähistatakse genotüübi kujul AFRQ/AFRQ. Topelt-heterosügootide puhul määratakse haplotüübid vastavalt suurima tõenäosuse põhimõttele (võetakse arvesse haplotüüpide esinemissagedused populatsioonis) või kasutatakse meetodit, mis näitab ära ainult ühe kromosoomi nukleotiidsest järjestusest tuleneva valguvariandi. Kuni 2007. aastani määrati *PRNP* genotüüpe kolme koodoni alusel (136, 154 ja 171). Kuna tuvastati üksikuid haigestunud ka skreipiresistentsse genotüübiga ARR/ARR lammaste seas, siis täpsemate uuringutega avastati nende juhtumite puhul seos polümorfismiga koodonis 141 CTT → TTT, mis viib leutsiini asendumisele fenüülalaniiniga vastavas peptiidahela positsioonis ja seda skreipi vormi hakati nimetama atüüpiliseks (Moum jt, 2005; Saunders jt, 2006). Kuna selle mutatsiooni sagedus oli madal, alla 1%, siis esialgu seda riskigruppide koostamisel ei arvestatud.

Kõige olulisemaks *PRNP* polümorfismiks on (klassikalise) skreipi resistentsuse seisukohast muutus koodonis 136, mis on kõrgema riskigrupi R5 määravaks markeriks. Kui koodon 136 kodeerib valiini (V) sünteesi, on loomad skreipile kõrgeima vastuvõtlikkusega. Kõige skreipi-resistentsem on R1 grupp, kuhu kuuluvad isendid genotüübiga ALRR/ALRR. Kui alleelidest üks on ALRR, kuulub loom R2 gruppi, v.a juhul, kui genotüüp on kombinatsioonis 136. koodoni V-variantiga (ALRR/V_ _ _). Sel puhul klassifitseeritakse loomad riskigrupi R4. R5 grupp moodustub genotüüpidest, kus üks alleel on V_ _ _ ja teine mõni muu variant kui ALRR. R3 gruppi klassifitseeruvad kõik ülejäänud genotüübid.

Skreipi-resistentsuse saavutamise programmides on kesksel kohal aretusloomade genotüüpiseerimine, mis võimaldab skreipile vastuvõtlike genotüüpidega lammaste karjast väljaselekteerimist. Eesti tumeda- ja eesti valgepealiste lammaste aretusprogrammides on skreipi-resistentsuse saavutamise üheks aretuseesmärgiks (ELaS, 2014^{a, b}; ETLA, 2015^{a, b}). ELKL ja ETLA aretusstrateegiatega on määratud lambakarjade skreipi-resistentsuse kolm tasandit, kus I või II taseme saamiseks ei ole lubatud kasutada muid jäärasid kui madalaimast R1 riskigrupist (genotüübiga ALRR/ALRR). Üldise põhimõttena on lubatud kasutada ainult R1 ja R2 aretuslambaid ja erandina R3 uttesid ning varem ka jäärasid (kuni 01.01.2008), kui resistentsse genotüübiga R1-R2 aretusloomi ei ole või on neid ebapiisavalt. Välditakse R3 lammaste kasutamist aretuses, aga nende lammaste karjast eemaldamist ei nõuta nagu on ettenähtud lammastega, kes kuuluvad riskigrupi R4 või R5. Sellise markerselektsiooni eesmärk on suurendada skreipile resistentsse ALRR ning vähendada vastuvõtliku VLRQ alleeli esinemissagedust.

Uuringu eesmärgiks oli hinnata valikust tingitud prioonigeeni geneetiliste variantide muutuse olulisust populatsioonis. Hinnati spetsiifilist markerselektsiooni mõju alleeli-, genotüübi- ja riskirühmade esinemissageduste muutuste alusel lammaste sünniaastate (1998–2017) lõikes, mis on kogutud Riikliku loomatauditõrje programmi 2005–2017 rakendumise perioodil.

Materjal ja meetodika

Lammaste skreipi-riski staatuse monitooringu raames genotüpiseeriti lambaid sünniaastatega 1998–2017. Genotüpiseeritud lammaste arv sünniaastate lõikes oli perioodil 2004–2014 keskmiselt 190. Vähem oli andmetes 1998–2003 ja 2015–2017 sündinuid (tabel 1). Analüüsis oli veidi rohkem eesti valgepealisi (EV) kui eesti tumedapealisi (ET) lambaid, vastavalt 1301 ja 1110 (sh ka ristandid parandajatõugudega), kokku 2411 lammast.

Riikliku loomatauditõrje programmi raames koguti vastavalt lammaste aretusorganisatsiooni poolt koostatud nimekirjade alusel igalt lambalt 5–10 ml K₃EDTA täisverd ja saadeti EMÜ VLI loomageneetika laboratooriumisse genotüpiseerimiseks. Tulenevalt Euroopa Komisjoni määrusest, millega (sõltuvalt liikmesriigi lambapopulatsiooni suurusest) kehtestati *PRNP* geeni-seireks nõutav lammaste arv (Euroopa komisjoni määrus 2245/2003), genotüpiseeriti Eestis igal aastal minimaalselt 100 lammast.

DNA eraldamiseks kasutati Miller jt (1988) modifitseeritud täisverest DNA eraldamise meetodit. DNA saagikust kontrolliti Nanodrop 2000-ga (Thermo Fisher Scientific, USA). Seejärel valmistati DNA töölahused kontsentratsiooniga 35 ng/μl. *PRNP* geeni polümorfismid tuvastati koodonite 136–171 piirkonnas sekveneerimise meetodil. *PRNP* geenifragmendi paljundamiseks polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR) võeti reaktsioonisegusse 3 μl DNA-d, lisati 0,45 μl programmi Praimer3 disainitud 5 pM pärisuunalist (5'-agc cac atg gtg gtg gag-3') ja vastassuunalist (5'-ctc tct ggt act ggg tga tgc-3') praimerit, 1,5 μl 25 mM MgCl₂, lisati 1,5 μl 10X puhvrit, 0,6 μl 5 mM dNTP-d, 0,25 μl 5 U Taq polümeraasi ning ddH₂O kuni 15 μl mahuni. PCR termotsükleri programm algas predenaturatsiooniga 96 °C juures 5 min, millele järgnes 35X tsükkel denaturatsiooniga 96 °C 15 sek, praimerite seondumisega 66 °C 10 sek ja DNA sünteesiga 72 °C 45 sek. Sellele omakorda järgnes lõplik süntees 72 °C juures 5 min ning lõpuks 4 °C püsiva temperatuuri säilitamine.

Tabel 1. Kogutud proovide arv sünniaastate ja tõugude lõikes
Table 1. Number of collected samples by birth year and breed

| | 1998–2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015–2017 | Kokku / Total |
|-------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|---------------|
| ET | 63 | 41 | 54 | 98 | 160 | 193 | 94 | 92 | 73 | 75 | 59 | 57 | 51 | 1110 |
| EV | 84 | 53 | 58 | 107 | 143 | 109 | 150 | 122 | 105 | 90 | 86 | 77 | 117 | 1301 |
| Kokku | 147 | 94 | 112 | 205 | 303 | 302 | 244 | 214 | 178 | 165 | 145 | 134 | 168 | 2411 |

ET – eesti tumedapealine lambatõug / *Estonian Blackhead sheep breed*; EV – eesti valgepealine lambatõug / *Estonian Whitehead sheep breed*

Tulemused ja arutelu

PRNP geeni varieeruvus ja alleelide esinemissagedused

Analüüsitud 2411 lambal määrati kokku 7 *PRNP* haplotüüpi (alleeli): ALRR, ALRQ, ALRH, ALHQ, AFRH, AFRQ ja VLRQ, mis olid esindatud nii juhuvalikuga aretuslammaste kui tootmiskarjade lammaste hulgas.

Esinemissageduselt prevaleerisid alleelid ALRR ja ALRQ (keskmised esinemissagedused 0,581 ja 0,306).

Amplifitseeritud 414 bp pikkust produkti kontrolliti 2,5% agarosgeelil, mis seejärel puhastati vabade nukleotiididest ja polümeraasist kasutades reagente FastAP (*Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) ja ExoI (*Exonuclease I*) lisades 5 μl PCR-i produktile 1 μl 10X FastAP puhvrit, 1 μl 10X ExoI puhvrit ning 0,9 μl 1 U FastAP ja 0,3 μl 20 U ExoI reagente. Segu kuumutati esmalt 30 min 37 °C juures, siis 20 min 80 °C juures ning jäeti seisma 4 °C juurde.

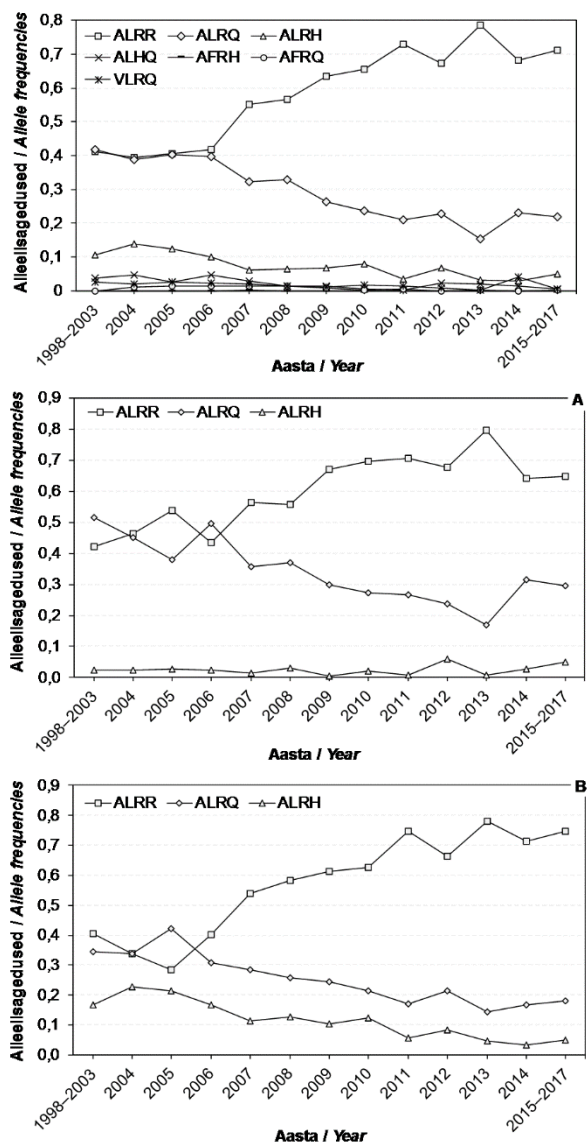
Sangeri sekveneerimisreaktsiooni jaoks kasutati *BigDye* v3.1 kitti (Applied Biosystems, USA). Reaktsiooniks kasutati 3 μl puhastatud PCR produkti. Sekveneerimisreaktsiooni produkti puhastamiseks ja väljasadamiseks kasutati 96% EtOH ja Na-atsetaati, puhastatud produkt lahustati formamiidis. Geeni järjestuste määramiseks kasutati geenianalüsaatorit ABI 3130 (Applied Biosystems, USA), toored sekvensi failid tehti loetavaks ja analüüsiti Sequences Analyses v5.2 (Applied Biosystems, USA), ja BioEdit programmidega.

Määratud *PRNP* geeni järjestuse põhjal tehti genotüpiseeritavatel lammastel kindlaks DNA polümorfismid vastavalt koodonites 136, 141, 154 ja 171. Saadud andmed kodeeriti genotüüpideks (prion)valgu tasandil (tähistati vastavalt aminohappelisele järgnevusele).

Võrreldi 13 sünniaastate gruppi nii populatsiooni kui eesti valgepealiste ja eesti tumedapealiste lammaste lõikes. Arvutati haplotüübi-, genotüübi- ja riskigruppide esinemissagedused, gruppidevahelisi erinevusi hinnati χ^2 testi abil. Samuti kontrolliti populatsiooni alleeli- ja genotüübisageduste vastavust Hardy-Weinbergi tasakaaluseadusele. Määrati efektiivsete alleelide arv *Ne* ja heterosügootsus ning fikseerumisindeks *F*. Varasemad (1998–2003) ja hilisemad (2015–2017) sünniaastate andmed summeeriti nende sünniaastatega loomade vähese arvu tõttu.

Antud artikli materjale on osaliselt kajastatud kogumikus "Terve loom ja tervislik toit" (Sild jt, 2018). Võrdlusmaterjalina on kasutatud Euroopa Toiduohutusalaste avaldatud materjale (EFSA, 2017).

ALRR alleelisageduste oluline tõus algas pärast 2006. aastat sündinud lammaste hulgas (joonis 1). Skreipi suhtes kõige vastuvõtlikum alleel VLRQ esines Eesti lambatõugudel suhteliselt harva ning monitooring näitas selle langevat trendi (0,024-lt 0,014-ni). Erandiks oli 2014. aasta, kus eesti valgepealistel lammastel tõusis VLRQ esinemissagedus 0,060-ni. Joonisel 1 näha olevad alleelisageduste kõikumised pärast 2011. aastat on seletatavad testitud loomade kontingendi muutusega, sest lisaks tõulammastele genotüpiseeriti ka tootmiskarjade lambaid.



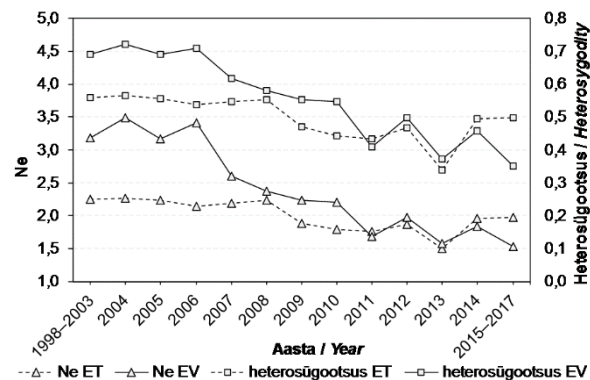
Joonis 1. PRNP alleelisageduste dünaamika Eesti lamba-populatsioonis sünniaastate 1998–2017 lõikes ja kõrgema esinemissagedustega alleelide esinemissagedused eesti tumedapealistel (A) ja eesti valgepealistel (B) lammastel.

Figure 1. The dynamics of the PRNP allele frequencies by birth year 1998–2017 in the Estonian sheep population and the predominant allele frequencies for Estonian Blackhead (A) and Estonian Whitehead (B) sheep.

Populatsiooni iseloomustas diversiteedinäitajate – efektiivsete alleelide arvu ja heterosügootsuse (joonis 2) langus. Tõugude lõikes langes efektiivsete alleelide arv ja heterosügootsus mõlemas tõus, kuid algase nende näitajate osas oli erinev. Efektiivsete alleelide arvu puhul oli langus 2013. aastaks võrreldes 2005. sünniaastaga vastavalt 2,3-lt 1,5-le eesti tumedapealistel ja 3,25-lt 1,5-le eesti valgepealistel lammastel. Heterosügootsus langes eesti tumedapealistel 0,56–0,34 ja eesti valgepealistel 0,69–0,37.

Selektiooni mõju oli statistiliselt oluline PRNP prevalveerivatele alleelidele – olulisuse nivoo oli kõrgeim eesti valgepealistel lammastel ($P < 0,001$), sealhulgas kõigi kolme kõrge esinemissagedusega

alleeli, ALRR, ALRH ja ALRQ puhul, ja tagasihoidlikum eesti tumedapealistel lammastel (ALRQ ja ALRR puhul $P < 0,01$), kui võrreldi ainult enne 2005. ja pärast 2015. sünninud lambaid. Madala esinemissagedusega alleelide gruppist oli statistiliselt oluline ka ALHQ alleelisageduse muutus ($P < 0,01$ eesti valgepealistel lammastel ja $P < 0,05$ tumedapealistel). Alleeli ALRR esinemissageduse tõus oli oodatav ja selge markerselektiooni mõju.



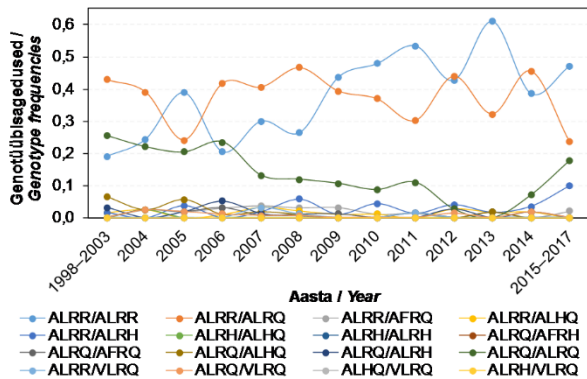
Joonis 2. PRNP efektiivsete alleelide arvu (N_e) ja heterosügootsuse muutused sünniaastate lõikes eesti tumedapealiste (ET) ja valgepealiste (EV) lammaste populatsioonis.

Figure 2. Changes in the number of effective alleles in PRNP (N_e) and heterozygosity by birth year in Estonian Blackhead (ET) and Estonian Whitehead (EV) sheep.

Genotüübid

Kokku leiti 16 erinevat genotüüpi, 12 eesti tumedapealistel ja 16 eesti valgepealistel lammastel. Kõige sagedasemad genotüübid olid ALRR/ALRR (mõlemal tõul 36%) ja ALRR/ALRQ (eesti tumedapealistel 39%, valgepealistel 29%). Järgnevad genotüübisagedused olid tumedapealistel lammastel ALRQ/ALRQ (13%) ja valgepealistel ALRR/ALRH (13%). Teisi genotüüpe esines sagedusega alla 10% (joonis 3 ja 4). Sünniaastate lõikes tõusis ALRR/ALRR genotüübi sagedus 1998–2005 aastate keskmise 27% juurest 2013–2017 aastate keskmise 49%-ni. Drastilisem oli genotüübi ALRR/ALRR esinemissageduse muutus eesti valgepealiste hulgas, kus genotüübisagedus tõusis 12%-lt kuni 55%-ni. Genotüübi ALRR/ALRQ puhul olid sünniaastate lõikes esinemissageduste muutused väiksemad. Võrreldes sünniaastagrupi lambaid järgneva sünniaastagrupiga, oli statistiliselt oluline erinevus eesti valgepealiste genotüübisagedustes aastate 2006/2007 ($P < 0,01$) ja 2013/2014 ($P < 0,05$) vahel. Alleeli- ja genotüübisagedused olid omavahelises vastavuses Hardy-Weinbergi tasakaaluseadusega ja valik üldiselt ei peegeldunud. Kõrvalekaldeid PRNP teoreetilise ja tegeliku genotüübijaotuse vahel leiti üksikutes sünniaasta/tõug gruppides, kuid mitte kõrge esinemissagedusega genotüüpide puhul. Statistiliselt oluliseks osutus hälve näiteks 2013. sünniaastaga eesti valgepealiste populatsiooni, kus hälvet teoreetiliselt mõjutas genotüüp ALHQ/VLRQ ($P < 0,001$).

Fikseerumisindeksi keskmine oli populatsioonis – 0,011 (sd 0,025), mis negatiivse väärtusena näitab *PRNP* heterosügootsete genotüüpide ülekaalu alleelisageduste põhjal oodatavale ja viitab välisaretusele/introducteeritud aretusmaterjali olulisusele. Ekstreemsemad näitajad ulatusid $F = 0,170$ -st (2005. sündinute hulgas) kuni $F = -0,166$ -ni (2012. ja 2013.). Kui eesti



Joonis 3. Eesti tumedapealiste lammaste *PRNP* genotüübisagedused sünniaastate lõikes.

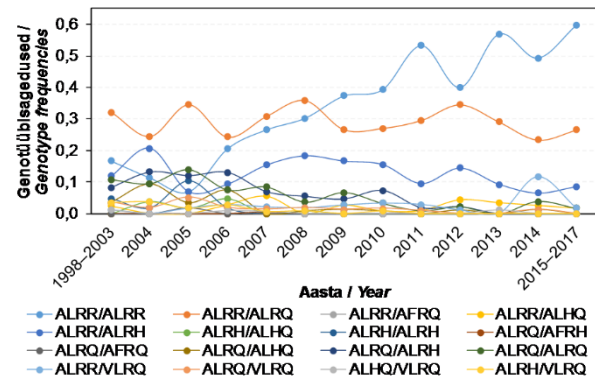
Figure 3. *PRNP* genotype frequencies in Estonian Blackhead sheep by birth year.

Riskigrupid

Pidades silmas skreipiriski vähendamist on oluline saavutada R1 grupi loomade võimalikult suur osatähtsus populatsioonis, mis tagaks kõrge skreipiresistentsuse ning väheneks skreipile vastuvõtlike R3–R5 gruppi kuuluvate lammaste osatähtsus. Uuring näitas, et lammastel suurenes R1 osatähtsus üle kahe korra, keskmiselt 49%-ni (sh eesti valgepealistel 55%-ni) ja vähenes R3–R5 gruppide osatähtsus 40–50%-lt perioodi alguses 10%-ni uuringuperioodi lõpul. Sünniaastagruppide järjestikune paariviisiline võrdlus näitas neis riskigruppide proportsioonides erinevusi eesti tumedapealistel lammastel sünniaastate 2005/2006, 2006/2007 ja 2008/2009 vahel ($P < 0,05$) ning eesti valgepealiste lammaste 2010/2011–2012/2013 sünniaastate vahel ($P < 0,05$). Statistiliselt olulisem oli muutus 2006/2007 ja 2013/2014 vahel valgepealistel lammastel ($P < 0,001$). Seega avaldus selektsiooni mõju pisut varem eesti tumedapealiste lammaste populatsioonile, kuid oli olulisem eesti valgepealistele lammastele. Eristades tõu- ja tootmiskarju, oli mõju tootmiskarjadele statistiliselt madalama tõepäraga kui tõukarjadele $P < 0,05$ ja $P < 0,001$.

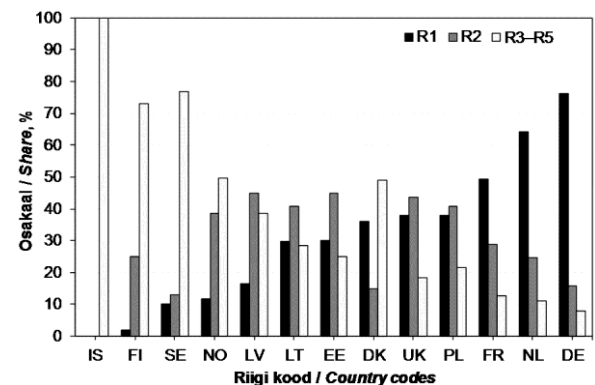
Võrreldes EFSA 2016. aasta kohta avaldatud andmeid Euroopa liikmesriikide ning Norra ja Islandi kohta, saab väita, et Eesti lambapopulatsioon on koos Läti ja Leedu populatsioonidega skreipiresistentsete gruppide R1 ja R2 osatähtsusest Euroopas keskmisel tasemel (joonis 5). Eesti lambapopulatsiooni R1 grupi osatähtsus (30%) oli 2016. aastal testitute puhul madalam kui näiteks Saksamaal ja Hollandis, kuid Eesti populatsioon oli võrreldes Islandi, Soome ja Rootsi ka oluliselt madalama vastuvõtlike riskigruppide R3–R5 osatähtsusega (25%). Madalama skreipiresistentsusega R2 lambaid oli 45%, mis on kooskõlas Eestis R2 riskigrupi kuuluvate jäärade aretusle lubamise ja kasutamisega (lisaks R1 jääradele).

valgepealiste populatsioonis olid peamiselt negatiivsed *F*-väärtused, siis eesti tumedapealiste lammaste puhul esines sünniaastagruppide lõikes äärmiselt kõrgeid positiivseid fikseerumisindeksi *F* väärtusi: 0,295 (2005. sündinute), 0,173 (2011.) ja 0,283 (2015.–2017. sündinute), mis omakorda võib olla tingitud sugulusaretatud lammaste valikust neil puhkudel.



Joonis 4. Eesti valgepealiste lammaste *PRNP* genotüübisagedused sünniaastate lõikes.

Figure 4. *PRNP* genotype frequencies in Estonian Whitehead sheep by birth year.



Joonis 5. Euroopa Toiduohutusameti (EFSA, 2017) andmetel koostatud tauditõrjeprogrammi geneetilise monitooringu tulemused 10 liikmesriigi ning Norra ja Islandi 2016. aasta kohta skreipi riskigruppide lõikes.

Figure 5. Scrapie genetic eradication programme monitoring data for ten EU member countries and Iceland and Norway from 2016 (EFSA, 2017).

Järeldused

Uuring näitas riikliku tauditõrjeprogrammi markerselektsiooni olulist mõju Eesti lambapopulatsioonile. Prioonvalgu geeni resistentsust ja vastuvõtlikkust markeerivate variantide esinemissageduste muutused ilmsid pärast 2005. aastal rakendatud määrust, kus paaride valiku suunatud mõju ilmsid 2007. sünniaastaga lammastel resistentsusmarkeri ALRR esinemissageduse statistiliselt olulise tõusuna. Analüüsitud ajaliselt sarnased eesti valgepealiste ja eesti tumedapealiste lammaste osas, kuid olulisemad muutused alleelija genotüübisagedustes ning riskigruppide profiilis olid toimunud eesti valgepealises lambatõus. Alates 2012. sünniaastagrupid täheleandavalt alleelisageduste suuremaid

kõikumisi, mis seletuvad juhuslike statistiliste (väiksem lammaste arv) ja valimi struktuuri (viimaste aastate juhuvalikus olnud tootmisfarmide ristandlambad) mõjudena. Viimaste sünniaastate gruppides oli rohkem skreipile vastuvõtlike riskirühmade R3–R5 lambaid ning algusaastale iseloomulik valiku efekt ALRR-alleeli suhtes jäi väiksemaks ning eesti tumedapealistel lammastel pigem langes. Programmi rakendamise saavutatud skreipi päriliku resistentsuse keskmine tase võrreldes naaberriikidega nii Põhja-Euroopas kui Kesk-Euroopas. Pidades silmas impordi tähtsust meie lambapopulatsioonile, oleks sellest lähtuvalt lammaste skreipiresistentsuse geneetilise seire jätkamine riikliku tauditõrjeprogrammi raames väga oluline.

Tänuavaldus

Uurimistöö viidi läbi Eesti Haridus- ja Teadusministeeriumi projekti IUT8-2 rahalisel toel.

Huvide konflikt / Conflict of interest

Autor kinnitab artikliga seotud huvide konflikti puudumist. *The author declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.*

Autorite panus / Author contributions

Kõik autorid osalesid katse kontseptsiooni väljatöötamises ja planeerimises, katseandmete analüüsis ja tõlgendamises ning lõpliku käsikirja toimetamises ja heaks kiitmisel. HV ja ES tegelesid andmete kogumisega. ES ja SV tegelesid käsikirja mustandi kirjutamisega.

All authors participated in the study conception and design, analysis and interpretation of data and critical revision and they approve the final manuscript. HV and ES acquired the data, ES and SV drafted the manuscript.

Kasutatud kirjandus

- Diener, T.O., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. 1982. Viroids and prions. – Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 79 (17):5220–5224.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2016. EUSR on Transmissible Spongiform Encephalopathies in 2015. – EFSA Journal, 14:4643, 62 pp.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2017. The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2016. – EFSA Journal, 15:5069, 68 pp.
- ELaS (Eesti Lambakasvatavate Selts) 2014^a. Eesti tumedapealise lambatõu (ET) aretusprogramm 2015–2021. – Märja 2014. http://lammas.ee/uus/wp-content/uploads/2017/09/ET_Aretusprogramm_2015_2021_9_02_15-1.pdf, 19.01.2018.
- ELaS (Eesti Lambakasvatavate Selts) 2014^b. Eesti valgepealise lambatõu (EV) aretusprogramm 2015–2021. – Märja 2014. http://lammas.ee/uus/wp-content/uploads/2017/09/EV_Aretusprogramm_2015_2021_9_02_15-3.pdf, 19.01.2018.
- ELKL (Eesti Lamba- ja Kitsekasvatavate Liit) 2017. Aretustegevuse aastaaruanne 2016. – Märja 2017. http://lammas.ee/uus/wp-content/uploads/2017/09/Aretusaruanne-2016_ELKL.pdf, 19.01.2018.
- ETLA (MTÜ Eesti Tõulammaste Aretusühing) 2015^a. Eesti tumedapealise lambatõu aretusprogramm. – Tartu 2015. https://etla.weebly.com/uploads/5/3/8/0/53808943/et_aretusprogramm.pdf, 19.01.2018.
- ETLA (MTÜ Eesti Tõulammaste Aretusühing) 2015^b. Eesti valgepealise lambatõu aretusprogramm. – Tartu 2015. https://etla.weebly.com/uploads/5/3/8/0/53808943/ev_aretusprogramm.pdf, 19.01.2018.
- ETLA (MTÜ Eesti Tõulammaste Aretusühing). 2017. Lammaste aretustegevuse aastaaruanne 2016. – ETLA 2017, 11 lk.
- Euroopa Komisjoni otsus 2003/100/EÜ. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/?qid=1516358809990&uri=CELEX:32003L0100>, 19.01.2018
- Euroopa Komisjoni otsus 2245/2003. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ET/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R2245&from=ET>, 16.04.2018
- Hagenaars, T.J., Melchior, M.B., Bossers, A., Davids, A., Engel, B., Van Zijderveld, F.G. 2010. Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance. – BMC Vet. Res., 6:25–25.
- Houston, F., Goldmann, W., Foster, J., González, L., Jeffrey, M., Hunter, N. 2015. Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. – PLoS ONE, 10:e0143251.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. – Nucleic Acids Res., 16:1215.
- Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Benestad, S.L. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. – J. Gen. Virol., 86:231–235.
- Prusiner, S.B. 1998. Prions. – Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95:13363–13383.
- Saunders, G.C., Cawthraw, S., Mountjoy, S.J., Hope, J., Windl, O. 2006. PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. – J. Gen. Virol., 87:3141–3149.
- Sild, E., Värvi, S., Viinalass, H. 2018. Lammaste skreipi-resistentsuse monitooring PRNP geeni markerite põhjal. – Konverentsi "Terve loom ja tervislik toit 2018" artiklite kogumik, Tartu: Eesti Maailikool. 86–92 lk.

The dynamics of hereditary scrapie resistance in Estonian sheep breeds

*Erkki Sild, Sirje Värvi, Haldja Viinalass
Estonian University of Life Sciences, Chair of Animal
Breeding and Biotechnology, Fr. R. Kreutzwaldi 1,
51006 Tartu, Estonia*

Summary

In accordance with EU regulations, the scrapie eradication programme started in Estonia in 2005. In the current study, 2,411 sheep (Estonian Blackhead and Estonian Whitehead sheep breeds) were included in the analyses for scrapie susceptibility based on PRNP genotypes. Polymorphisms in codons 136, 141, 154 and 171 of the PRNP gene were determined and the allele, genotype and risk group frequencies were calculated. Seven different alleles (haplotypes) and 16 different genotypes were found in the Estonian sheep population. The study showed a significant effect of the marker selection on the Estonian sheep, between the birth year groups of 1998–2017. Statistically significant changes in the gene frequencies were found in the sheep group born two years after the application of marker-based selective breeding in 2007. In addition to the temporal rise in the resistant ALRR allele frequency, the genotype and risk group profile changed

in the sheep population by the birth year groups'. The analysed temporal changes were relatively similar between the Estonian Whitehead and the Estonian Blackhead sheep breeds. Higher significance in changes in the allele and genotype frequencies and the risk group distributions were estimated for the Estonian Whitehead sheep compared to the Estonian Blackhead sheep. From 2012, larger fluctuations in allele frequencies were observed, partly due to random statistical effects and the lower number of sheep in the more recent birth year groups, as well as due to the inclusion of a higher proportion of sampled (crossbred) animals from commercial flocks. There was a slight rise in the frequencies of sheep in risk groups R3–R5 susceptible to scrapie in the last birth year groups as well as a lower level of ALRR allele frequency, particular in the Estonian Blackhead sheep. Compared to EFSA data on the distribution of genotypes in the EU and other reporting countries in 2016, the Estonian sheep population showed an intermediate position between Nordic and Central European countries in regard to susceptibility to scrapie (R3–R5 groups). Due to the active import of foreign breeding material it is of utmost importance to continue the genetic monitoring of the Estonian sheep population for scrapie resistance in the framework of the National Infectious Animal Disease Control Programme.