

# Polimorfizm genu PRNP w kodonach 136, 154 i 171 u polskich ras owiec\*)

ROMAN NIŻNIKOWSKI, GESINE LÜHKEN\*, EWA STRZELEC, SHIRIN LIPSKY\*, DOMINIK POPIELARCZYK, GEORG ERHARDT\* I KONSORCJUM ECONOGENE\*\*

Zakład Hodowli Owiec i Kóz Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Polska

\*Instytut Hodowli i Genetyki Zwierząt Domowych Wydziału Rolniczego Uniwersytetu Justusa-Liebiga, Ludwig Strasse 21<sup>B</sup>, 35390 Gießen, Niemcy

\*\*Konsorcjum ECONOGENE (Paolo Ajmone-Marsan, Michael Bruford, Susana Dunner, Georg Erhardt, Gabriela Obexer-Ruff, Pierre Taberlet, Alessio Valentini, Régis Caloz, Andreas Georgudis, Gabriele Canali, Jutta Roosen, Paulo Crepaldi, Inci Togan, Augustin Vlaic, Roman Niżnikowski, László Fésüs, Okan Ertugrul, Mohamoud Abo-Shekada, Mohamed El Barody, Anila Hoda, Michel Trommetter), Instytut Zootechniki Wydziału Rolniczego Uniwersytetu Katolickiego im. Świętego Serca w Piacenzy, Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza, Włochy

Niżnikowski R., Lühken G., Strzelec E., Lipsky S., Popielarczyk D., Erhardt G. and Consortium ECONOGENE  
PRNP gene polymorphism in 136, 154 and 171 codons in Polish sheep breeds

## Summary

The study was conducted on six Polish sheep breeds (Polish merino, Zelaznenska sheep, Pomeranian, Kamieniecka sheep, Polish mountain sheep and Polish heath sheep). Individual blood samples were collected and DNA was extracted. The frequencies of alleles (ARR, ARH, ARQ, AHQ, VRQ) and its genotypes of PRNP gene were determined according to the RFLP-PCR method.

Depending on the breed and sex, a high diversity of polymorphous forms of the PRNP gene was observed. Higher PRNP gene polymorphism was observed in ewes than in rams. The lowest frequency of alleles was determined in three breeds: Polish merino (ARR, ARQ and VRQ), Polish mountain sheep and Polish heath sheep (ARR, ARQ and AHQ). All five of the determined alleles were observed in Pomeranian and Kamieniecka sheep. The most advantageous frequencies of ARR allele occurred in Polish merino, Kamieniecka and Zelaznenska sheep (particularly in ewes). In Polish mountain sheep and Polish heath sheep the VRQ allele was not observed. In the final results, 11 combinations of genotypes occurred in six Polish sheep breeds. The obtained results indicate a need for the construction of an appropriate breeding program for each breed separately. These breeding programs should enable obtaining higher frequencies of ARR allele occurrence and restricting the incidence of other alleles of the PRNP gene, particularly VRQ allele.

**Keywords:** sheep, scrapie, PRNP

W 2001 r. Parlament UE ustanowił reguły prawne dotyczące zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażalnych encefalopatii gąbczastych (regulacja nr 999/2001/EC) (7).

W 2003 r. poprzez decyzję nr 2003/100/EC (8), Komisja Europejska ustanowiła obowiązkowe utworzenie schematów hodowlanych skierowanych na zwiększanie genetycznej oporności na trzęsawkę w każdej z ras owiec w Europie. Ponadto w regulacji nr 260/2003/EC (9) postanowiono o zwalczaniu TSE u owiec i kóz oraz uregulowano kwestię handlu żywymi owcami i kozami oraz embrionami bydła. Trzęsawka (scarpie), podobnie jak BSE u krów i choroba Creutzfeldta-Jakoba u ludzi, jest naturalnie pojawiającą się formą pasażalnej encefalopatii gąbczastej (TSE). Przypuszcza się, że białko prionowe (PrP) jest odpowiedzialne za występowanie trzęsawki u owiec.

\*) Badania wykonane w ramach programu 5 Unii Europejskiej, projekt nr QLKC-CT-2001-02461.

W genie PRNP zaobserwowano szereg polimorfizmów w kodonach 136, 154 i 171, który wydaje się odpowiedzialny za (genetyczną) oporność lub wrażliwość na trzęsawkę (1, 2, 5).

Ponadto stwierdzono, że allel ARR gwarantuje najmniejszą wrażliwość na trzęsawkę. Zaobserwowano, że w Wielkiej Brytanii i w Holandii allel VRQ, a w innych krajach Europy allele ARQ i AHQ są odpowiedzialne za duży stopień wrażliwości na trzęsawkę. Allel VRQ występował najrzadziej u owiec, u których stwierdzono kliniczne objawy trzęsawki. Dlatego też selekcja na allel ARR jest podstawowym narzędziem eliminowania i kontroli trzęsawki u owiec (3-5). Podjęto próbę zmonitorowania frekwencji pięciu alleli trzęsawki (ARR, ARH, ARQ, AHQ, VRQ) oraz ich genotypów występujących u takich krajowych ras owiec, jak: wrzosówka polska, polska owca góraska, owca kamieniecka, owca pomorska, owca żelaznenska oraz merynos polski.

## Materiał i metody

W okresie od lipca 2002 r. do maja 2003 r. badaniom poddano owce sześciu krajowych ras: merynos polski, owca żelazneńska, pomorska, kamieniecka, polska owca górska i wrzosówka. Liczbę zwierząt z uwzględnieniem płci i wieku wg ras przedstawia tab. 1.

W celu określenia polimorfizmu genu PRNP pobrano próbki krwi od możliwie niespokrewnionych ze sobą zwierząt pochodzących z różnych rejonów Polski. Stada merynosa polskiego występowały na terenie woj. kujawsko-pomorskiego w gminach: Kruszwica, Złotniki Kujawskie, Pakość, Zbójno, Lipno, Łabiszyn, Inowrocław i Mogilno. Stada rasy należącej do grupy polskich owiec nizinnych – owcy żelazneńskiej – zlokalizowane były w woj. łódzkim (gm. Skierniewice) i podlaskim (gm. Janów). Polskie owce długowłose występowały, odpowiednio dla rasy kamienieckiej: w woj. warmińsko-mazurskim (gm. Bisztynek, Szczytno, Susz, Iława) i mazowieckim (gm. Kucz-bork-Osada i Sierpc) oraz dla rasy pomorskiej: w woj. pomorskim (gm. Wicko, Szemud, Chmielno, Steżyce, Łęczyce, Stara Kiszewa) i zachodnio-pomorskim (gm. Szczecinek, Postomino, Sławno). Stada polskiej owcy górskiej pochodziły z rejonu woj. małopolskiego z gmin: Nowy Targ, Szaflary i Łapsze Niżne. Stada owiec rasy wrzosówka zlokalizowane były na terenach województw: łódzkiego (gm. Skierniewice), podlaskiego (gm. Janów, Korycin, Kuźnica i Sokółka), wielkopolskiego (gm. Trzcianka) oraz zachodnio-pomorskiego (gm. Połczyn Zdrój).

Krew do badań pobierano z żyły jarzmowej owiec, używając jako konserwantu EDTA (wersenianu sodu). Następnie po jej odwirowaniu przy prędkości 4200 rpm pozyskano frakcję leukocytów.

Określono polimorfizm aminokwasów genu białka prionowego (PRNP) w kodonach 136 (A/V), 154 (R/H) i 171 (Q/R/H). Genomowe DNA zostało wyekstrahowane z leukocytów i poddane analizie według zmodyfikowanej metody Lühken i wsp. (5). Polimorfizm PRNP w badanych próbkach analizowano metodą PCR-RFLP (polimerase chain reaction - restriction fragments lengths polymorphism). W tym celu namnażano dwa fragmenty genu PRNP (U67922 GenBank) kodującego białko prionowe (PrP), odpowiednio o długości 193 i 191 pz metodą PCR. W skład mieszaniny reakcyjnej weszły: genomowy DNA (około 200 ng), specyficzne genowo startery (20 pmola każdy), mieszanina dNTPs (5 mM każdy), MgCl<sub>2</sub> do końcowego stężenia 2,5 mM, 0,1 U Taq polimerazy. Reakcję prowadzono według programu: 94°C – 1,5 min.; 40 cykli: 94°C – 20 s, 56°C – 20 s, 72°C – 20 s; 72°C – 5 min. Sekwencje użytych starterów przedstawiały się następująco: forward – 5'-GGCAGGAGCTGCTG-CAGCT-3' (taki sam, zarówno dla namnożenia fragmentu o długości 193 i 191 pz), reverse – 5'-CACAAAGTTGT-TCTGGTACTATC-3' (dla namnożenia fragmentu o długości 193 pz) i reverse – 5'-CAAAGTTGTTCTGGTACTA-TAT-3' (dla namnożenia fragmentu o długości 191 pz). Sekwencja startera forward została zaprojektowana w oparciu o zapis nukleotydowy genu PRNP na odcinku od 22622 do 22640 nukleotydu, a reverse – w oparciu o fragment DNA genu od 22791 do 22814 nukleotydu (193 pz) i od 22790 do 22812 (191 pz). Reverse starter (191 pz) zmodyfikowano w taki sposób, że w przypadku, gdy kodon 171 genu PRNP kodował argininę otrzymany produkt PCR posiadał miejsce

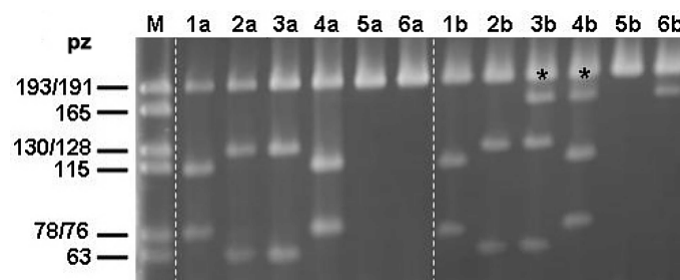
Tab. 1: Liczba zwierząt i struktura wiekowa badanych ras owiec

Rasa	Liczba stad	Liczba zwierząt	Liczba sztuk		Wiek od-do (lata)	
			tryków	maciorek	tryków	maciorek
Wrzosówka (WRZ)	10	31	11	20	1-4	1-7
Polska owca górska (POG)	11	31	11	20	1-2	1-5
Pomorska (POM)	11	31	11	20	1-7	1-6
Kamieniecka (KAM)	10	31	10	21	1-5	3-8
Żelazneńska (ZEL)	2	31	9	22	1-5	1-8
Merynos polski (MP)	11	31	11	20	2-6	2-10

restrykcyjne rozpoznawane przez enzym BspDI. W przypadku, gdy namnożone fragmenty posiadały kodon kodujący walinę w pozycji 136 i histydyne w pozycji 154, tworzyły się miejsce restrykcyjne dla enzymu BspHI. Zmienione nukleotydy względem właściwej sekwencji PRNP zostały wyróżnione pogrubieniem i podkreśleniem (ryc. 1).

W celu trawienia fragmentu o długości 193 pz enzymem BspHI i podwójnego trawienia fragmentu o długości 191 pz enzymami BspHI i BspDI równocześnie, próbki były inkubowane przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Elektroforeza została przeprowadzona w 3,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Dodatkowo przeprowadzono sekwencjonowanie produktów PCR i sklonowanych fragmentów PCR w plazmidzie, w celu zweryfikowania haplotypów w przypadku wieloheterozygotycznych genotypów. Fragmenty PCR o długości 257 pz zawierające kodony 136, 154 i 171 zostały namnożone przy użyciu starterów: forward 5'-AACCAACAT-GAAGCATGTGGCA-3' i reverse: 5'-TGGTGGTGACT-GTGTGTTGCTT-3', które są komplementarne do sekwencji genu PRNP odpowiednio od 22 604 do 22 625 oraz od 22 839 do 22 860 nukleotydu. Do bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR i rekombinowanych plazmidów, niosących namnożone fragmenty genu, użyto jednego z dwóch starterów, które wcześniej były wykorzystane w reakcji PCR.

Bezpośrednie sekwencjonowanie części próbek przeprowadzono na sekwenatorze ABI PRISM 377 (Applied Biosys-



Ryc. 1. Genotypowanie PRNP metodą PCR-RFLP. Próbkę DNA pochodzące od owiec o różnych genotypach (1-6: 1, AHQ/ARQ; 2, ARQ/VRQ; 3, ARR/VRQ; 4, ARR/AHQ; 5, ARQ/ARQ; 6, ARR/ARQ) poddano rozdzielni elektroforetycznej na żelu agarozowym z bromkiem etydyny. a: Produkt PCR o długości 193 pz trawiony enzymem BspHI; b: Produkt PCR o długości 191 pz trawiony enzymami BspHI i BspDI. Otrzymane fragmenty o odpowiednich długościach (pz) zaznaczono na rysunku. M, marker: mieszanina próbek standardowych (allele PRNP: ARQ, ARR, VRQ i AHQ), namnażane metodą PCR dla fragmentu „b” i trawione enzymami BspHI i BspDI. \*: po strawieniu próbek o genotypach ARR/VRQ i ARR/AHQ wg procedury „b”, pojawił się dodatkowy fragment o długości 193 pz bez znaczenia diagnostycznego

tems, Foster City). Sekwencjonowaniu zostały poddane co najmniej 3 różne próbki z każdego genotypowania metodą PCR-RFLP w celu zweryfikowania rezultatów i określenia właściwych warunków PCR-RFLP. Całkowita ilość próbek poddanych sekwencjonowaniu wynosiła ok. 10% całości próbek DNA. Sekwencjonowanie potwierdziło rezultaty otrzymane przy pomocy RFLP we wszystkich próbkach.

Uzyskane informacje posłużyły do obliczenia frekwencji genów i genotypów, zarówno w obrębie rasy, jak i płci oraz łącznie obu płci w obrębie rasy, co przedstawiono w tab. 2 oraz na rycinach 1, 2 i 3.

## Wyniki i omówienie

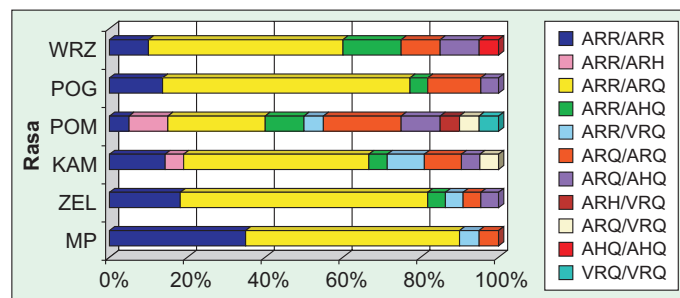
Rozkład frekwencji alleli u maciorek i tryków został przedstawiony w tab. 2. Wszystkie formy alleliczne stwierdzono tylko u owcy pomorskiej. Najbardziej pożądaną allel ARR znaleziono w wszystkich badanych rasach owiec, szczególnie wysoki udział uzyskano u merynosa polskiego i owcy żelazneńskiej. Cztery allele znaleziono u maciorek żelazneńskich (wszystkie z wyjątkiem ARH), a w pozostałych rasach po trzy formy alleliczne w różnych układach. Uznany za niekorzystny allel VRQ znaleziony został u maciorek czterech ras: mery-

nosa polskiego, żelazneńskiej, pomorskiej (najwyższa frekwencja) i kamienieckiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że u wrzosówki polskiej i polskiej owcy górskiej nie stwierdzono allelu VRQ, co wskazywać może na uwarunkowania znacznej odporności tych ras na trzęsawkę. Z kolei u tryków allel VRQ znaleziony został tylko u owcy żelazneńskiej i pomorskiej, u której ponadto nie znaleziono allelu ARH. Wskazuje to na występowanie mniejszego zróżnicowania form allelicznych u tryków w porównaniu do maciorek czterech ras: merynosa polskiego, owcy żelazneńskiej, pomorskiej i kamienieckiej. Występowanie u tryków wszystkich ras allelu ARR wskazuje na możliwość prowadzenia skutecznej selekcji w kierunku zwiększenia frekwencji jego występowania, co sugerują również i inni autorzy (3-5).

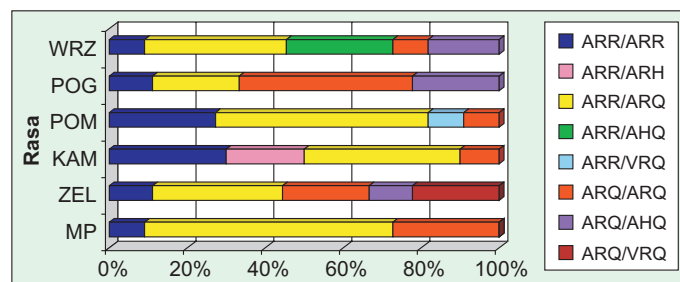
Frekwencję występowania genotypów PRNP u obu płci przedstawiono na ryc. 1 i 2. U obu płci znaleziono wiele kombinacji układów allelicznych. W przypadku maciorek (ryc. 1) zdecydowanie największą liczbę genotypów wykazano u owcy pomorskiej, a następnie u owcy kamienieckiej. Ponadto u owcy pomorskiej znaleziono maciorę VRQ/VRQ oraz zdecydowanie najniższy udział genotypu ARR/ARR. Allel VRQ w pozostałych rasach

Tab. 2. Frekwencja alleli PRNP (%) u wybranych ras owiec w Polsce

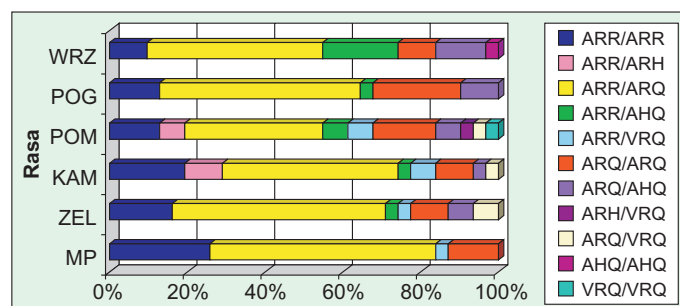
Wyszczególnienie	Frekwencja alleli (%)				
	ARR	ARH	ARQ	AHQ	VRQ
<b>Merynos polski</b>					
Ogólnie	56,5		41,9	4,8	1,6
Tryki	40,9		59,1		
Maciorki	65,0		32,5		2,5
<b>Owca żelazneńska</b>					
Ogólnie	46,8		43,6	4,8	4,8
Tryki	27,8		55,6	5,5	11,1
Maciorki	54,5		38,6	4,6	2,3
<b>Owca kamieniecka</b>					
Ogólnie	51,6	4,8	35,5	3,3	4,8
Tryki	60,0	10,0	30,0		
Maciorki	47,6	2,4	38,1	4,8	7,1
<b>Owca pomorska</b>					
Ogólnie	40,3	4,8	38,7	6,5	9,7
Tryki	59,1		36,4		4,5
Maciorki	30,0	7,5	40,0	10,0	12,5
<b>Polska owca górska</b>					
Ogólnie	40,3		53,2	6,5	
Tryki	22,2		66,7	11,1	
Maciorki	47,7		47,7	4,6	
<b>Wrzosówka polska</b>					
Ogólnie	41,9		38,7	19,4	
Tryki	40,9		36,4	22,7	
Maciorki	42,5		40,5	17,5	



Ryc. 2. Frekwencja genotypów PRNP (%) u maciorek badanych ras owiec



Ryc. 3. Frekwencja genotypów PRNP (%) u tryków badanych ras owiec



Ryc. 4. Frekwencja genotypów PRNP (%) u obu płci badanych ras owiec

(patrz tab. 2) występował w formie heterozygotycznej w kombinacjach z różnymi genami PRNP. Najmniejsze zróżnicowanie w tym zakresie obserwowano u merynosa polskiego, polskiej owcy górskiej i wrzosówki. Najkorzystniejszy genotyp ARR/ARR w największym udziale stwierdzono u merynosa polskiego, a następnie u owcy żelaznej i kamienieckiej. Frekwencja genotypów u tryków (ryc. 2) nie wykazała tak znacznego zróżnicowania jak u maciorek (ryc. 3). Nie znaleziono ani jednego tryka posiadającego genotyp VRQ/VRQ. Allel VRQ egzystował tylko u dwóch ras (ryc. 3) i to tylko w formie heterozygotycznej. W przeciwieństwie do maciorek najwyższą frekwencję genotypu ARR/ARR stwierdzono u owcy pomorskiej i kamienieckiej. Za niekorzystne uznać należy stosunkowo niską frekwencję tego genotypu u merynosa polskiego. Generalnie wykazano dalece posunięte zróżnicowanie w frekwencji genotypów u maciorek i tryków. U maciorek znaleziono znacznie więcej kombinacji aniżeli u tryków oraz znacznie więcej niekorzystnych uwarunkowań genetycznych przy stosunkowo wyższej częstotliwości występowania genotypu ARR/ARR w porównaniu do tryków. Fakt ten wynikać może z liczebności monitorowanych zwierząt, ale mimo faktu przebadania mniejszej liczby tryków na uwagę zasługuje fakt ich oddziaływania na dużą populację potomstwa, co w konsekwencji prowadzi do stwierdzenia, że przede wszystkim ta grupa zwierząt powinna zostać poddawana genotypowaniu, co podkreślali również inni autorzy (1-6).

Zestawienie łączne frekwencji alleli i genotypów u obu płci łącznie przedstawiono odpowiednio w tab. 2 i na ryc. 3. Ten obraz wskazuje na dość duży udział pożądanego uwarunkowania jakim jest niewątpliwie znaczny udział allelu ARR (tab. 2). Niekorzystny z punktu widzenia niskiej oporności na trzęsawkę allel VRQ występował w czterech rasach (merynos polski, owca żelazna, pomorska i kamieniecka), szczególnie na wysokim poziomie u owcy pomorskiej i kamienieckiej. Porównując jednak te wyniki do rezultatów osiągniętych w pracach innych autorów, częstotliwość występowania allelu ARR w krajowych rasach owiec jest znacznie wyższa aniżeli w rasach zagranicznych (3-6). Za korzystny należy uznać rezultat braku występowania allelu VRQ u wrzosówki i polskiej owcy górskiej. Zestawienie wyników dotyczących frekwencji genotypów (ryc. 3) wskazuje na fakt występowania w populacji badanych owiec 11 uwarunkowań. Najwięcej, bo aż 10 wykazano u owcy pomorskiej. W tejże rasie znaleziono także osobnika homozygotycznego pod względem allelu VRQ. Najmniejsze zróżnicowanie występowania kombinacji genetycznych stwierdzono u merynosa polskiego (tylko 4 kombinacje) oraz u polskiej owcy górskiej (5 kombinacji), co wskazuje na relatywnie wysoki stopień wyrównania genetycznego w tych rasach w zakresie badanych uwarunkowań. Za ciekawy należy uznać fakt, iż mimo braku selekcji w tym kierunku, częstotliwość występowania różnych genotypów jest niska w rasach o długo prowadzonej pracy hodowlanej, w szczególności w rasach rodzimych, na co wskazywali również i inni badacze (1, 3, 5). Generalnie z przeprowadzonego monitoringu występowania genotypów wrażliwych na trzęsawkę, wskazać można na konieczność organizacji programu hodowlanego zmierzającego do wyeliminowania niekorzystnych

uwarunkowań, w tym przede wszystkim allelu VRQ, przy dążeniach do ciągłego zwiększania częstotliwości występowania allelu ARR.

### Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań monitoringowych dotyczących sześciu krajowych ras owiec, stwierdzono występowanie wszystkich 5 alleli genu PRNP. Najniższym zróżnicowaniem form allelicznych genu PRNP charakteryzowały się owce ras: merynos polski (ARR, ARQ i VRQ), polska owca górska i wrzosówka (ARR, ARQ i AHQ). Natomiast wszystkie pięć alleli obserwowano u polskich owiec długowłnistych (pomorska i kamieniecka). Z kolei najbardziej korzystną frekwencję allelu ARR wykazano u merynosa polskiego, owcy kamienieckiej i żelaznej, w szczególności u maciorek. U polskiej owcy górskiej i wrzosówki nie stwierdzono występowania allelu VRQ. Natomiast u badanych ras owiec znaleziono łącznie 11 genotypów, których kombinacja jest odzwierciedleniem frekwencji alleli i jest zróżnicowana w zależności od rasy. Wykazano również znacznie większe zróżnicowanie zarówno częstotliwości występowania alleli, jak i genotypów u maciorek w porównaniu z trykami.

Przeprowadzone badania wskazują na potrzebę opracowania programu hodowlanego, którego celem będzie monitoring występowania uwarunkowań genetycznych trzęsawki oraz na drodze selekcji oddziaływanie na ograniczenie występowania niekorzystnym uwarunkowaniom (VRQ) oraz wzrost częstotliwości występowania allelu ARR w krajowym pogłowie owiec. Działalność taka jest bardzo potrzebna, również ze względu na stosowne dyrektywy Unii Europejskiej (7-9), do których honorowania Polska została zobowiązana. Stosowne programy hodowlane należy opracować dla każdej rasy z osobna, ze względu na występujące różnice w frekwencji alleli i genotypów genu PRNP.

### Piśmiennictwo

1. O'Doherty E., Aherne M., Ennis S., Weavers E., Roche J. F., Sweeney T.: Prion protein gene polymorphisms in pedigree sheep in Ireland. *Res. Vet. Sci.* 2001, 70, 51-56.
2. Gombojav A., Ishiguro N., Horiuchi M., Serjmyadag D., Byambaa B., Shingawa M.: Amino acid polymorphisms of PrP gene in Mongolian Sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 2003, 65, 75-81.
3. Kaal L., Windig J.: Rare sheep breeds and breeding for scrapie resistance in the Netherlands. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association of Animal Production (EAAP), 5-8.06.2005, Uppsala, Sweden 2005, 11, 375.
4. Kaam J. B. C. H. M. van, Finocciaro R., Vitale M., Portolano B., Vitale F., Caracappa S.: PrP allele frequencies in non-infected Valle del Belice and infected cross-bred flocks. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association of Animal Production (EAAP), 5-8.06.2005, Uppsala, Sweden 2005, 11, 376.
5. Lühken G., Buschmann S., Groschup M. H., Erhardt G.: Prion protein allele A<sub>136</sub>H<sub>154</sub>Q<sub>171</sub> is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch. Virol.* 2004, 149, 1571-1580.
6. Matthews D.: Scrapie – an overview; policy issues and potential eradication measures. 56<sup>th</sup> Annual Meeting of European Association of Animal Production (EAAP), 5-8.06.2005, Uppsala, Sweden 2005, 11, 374.
7. Regulacja nr 999/2001/EC: Reguły prawne z zakresu zapobiegania, kontroli i zwalczania pasażowalnych encefalopatii gąbczastych. Unia Europejska, Bruksela 2001.
8. Regulacja nr 2003/100/EC: Decyzja Komisji Europejskiej w sprawie ustanowienia obowiązku tworzenia schematów hodowlanych prowadzących do zwiększenia genetycznej oporności na trzęsawkę u każdej z ras owiec w Europie. Unia Europejska, Bruksela 2003.
9. Regulacja nr 260/2003/EC.: Ustanowiono obowiązek zwalczania TSE u owiec i kóz oraz uregulowano handel żywymi owcami i kozami bydłocymi. Unia Europejska, Bruksela 2003.

Adres autora: prof. dr hab. Roman Niżnikowski, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: niznikowski@alpha.sggw.waw.pl