

OSSERVAZIONI CRITICHE SUL PROTOCOLLO PLL

Di [Giuseppe Pisana](#), Giovedì 4 ottobre 2012 alle ore 15:13

1. I test del DNA per la PLL eseguiti in laboratori accreditati diversi da OFA devono essere rieseguiti secondo la modalità descritta dal protocollo in vigore?
2. I figli di genitori entrambi Clear devono eseguire il test prima di riprodursi? Se sì per quale motivo? C'è il pericolo che la PLL possa essere di tipo multifattoriale o perché non si ritiene attendibile il test dei genitori? Si richiede di motivare tale scelta.
3. In merito all'accoppiamento tra carrier x clear nello specifico quando si dice: "mettere in riproduzione carrier solo se tipici e perciò ritenuti utili all'allevamento, così definiti dal Giudice specialista nella relazione di giudizio durante il Raduno Annuale", come si deve agire in questo periodo che intercorre tra la data dell'attuazione e il prossimo raduno nazionale del 30 marzo 2013? Nessun Carrier può accoppiarsi oppure si fa riferimento al verbale del raduno nazionale di Tolentino del 31 marzo 2012?
4. Le convenzioni tra Atavi e veterinari/laboratorio Ofa sono già stati intrapresi? Quando sarà possibile fare i test con queste convenzioni?
5. I paesi membri dell'UMAVI recepiscono lo stesso protocollo? Se sì i volpini carrier esteri come possono essere riconosciuti idonei all'accoppiamento con clear? Devono necessariamente partecipare al raduno nazionale in Italia? Quale modalità verrà usata per identificare i riproduttori utili all'allevamento?
6. Secondo noi è necessario far recepire il protocollo a livello ENCI, in modo che tutti volpini italiani, riconosciuti tali, siano testati prima di riprodursi. E' necessario aggiungere alla visita oculistica, che escluda le oculopatie generiche, anche il test del DNA per la PLL, per poter essere "riproduttore selezionato".
7. Sarebbe opportuno chiedere ad un esperto genetista, che in base alla popolazione e al grado di consanguineità, ci dica se è necessario utilizzare i carrier x clear. Se sì, ci potrebbe indicare le modalità più opportune, per esempio fissando un arco di tempo oppure un numero di figli clear. Questo al fine di non avere una deriva genetica che potrebbe portare altri problemi ancor più gravi.

PLL: "DAI PRIMI SEGNALI AL TEST GENETICO NELL'ALLEVAMENTO." del dott. Reiner Beuing

Di [Mirò Volpino Italiano](#), Lunedì 16 luglio 2012 alle ore 21:12

(img:2945113727071)

Il documento è veramente interessante! Fa riferimento all'esperienza PLL di un' altra razza canina. Il Club tedesco dei *Deutscher Jagdterrier* ha iniziato a studiare la malattia e a fare prevenzione già negli anni '70, con 40 anni di anticipo sull'uscita dei test genetici nel 2009! Nel *Volpino Italiano* la percentuale carrier viene valutata intorno al 25-30 %, anche se dai risultati OFFA i valori sono i seguenti: 96 Volpini testati, 36 CARRIER = 37,5; + 2 MALATI (http://volpinoitaliano.ca/pll_results_offa.html)!!! Questo dato è veramente allarmante, inquanto è una percentuale decisamente superiore al 6,2% odierno della razza a cui fa riferimento l'articolo. E' evidente che il *Volpino Italiano* sia fortemente a rischio, in considerazione anche del ridottissimo pool genetico. Secondo me, le risposte devono arrivare da genetisti di provata competenza, da un piano di allevamento condiviso, dalla collaborazione di allevatori e privati e non da improbabili intenditori di razza.

La lussazione del cristallino nella razza Deutscher Jagdterrier

(traduzione di parte dell' articolo apparso sul giornalino ufficiale del Deutscher Jagdterrier Club e. V. che ci ha gentilmente concesso la sua pubblicazione)

Dai primi segnali al test genetico nell'allevamento del Deutscher Jagdterrier dott. Reiner Beuing, Gießen

La lussazione del cristallino (LL) accompagna l'allevamento del terrier da caccia già da parecchi anni. Tutto iniziò quando il futuro segretario d'allevamento Wolfgang Bierwirth registrò la malattia ereditaria all'interno delle sue gabbie, presso l'allevamento "Vom Sonnenstein". Egli volle esaminare a fondo la questione, trovò in libri specializzati la descrizione della **lussazione del cristallino** e scoprì, dopo aver interrogato altri allevatori, di non essere l'unico interessato dalla patologia. Delle ricerche evidenziarono che il riproduttore "Arco von der Fuchskaute", sovente impiegato, diffondeva il gene. Egli e due dei suoi fratelli erano/divennero ciechi. Da allora in poi si divenne più sensibili, ma purtroppo anche più cauti per evitare che il proprio allevamento finisse sotto i riflettori del pubblico.

Quando negli anni '70 Wolfgang Bierwirth si rivolse all'istituto per la riproduzione animale per avere informazioni circa la percentuale di ereditarietà di certe malattie, si parlava ancora pochissimo di **lussazione del cristallino (LL)**. La trasmissione dei suoi dati di esami svolti a partire dal numero 7000 del registro di allevamento, vale a dire poco la Seconda Guerra Mondiale, permise la ricerca e la registrazione computerizzata delle varie attività di riproduzione ed allevamento. Il Deutscher Jagdterrier era il primo cane dell'Associazione Cinofila Tedesca e gettò quindi le basi per gli sviluppi futuri.

All'epoca i supporti di informazioni più diffusi erano ancora le schede perforate, ma esse vennero ben presto sostituite dal computer con le sue innumerevoli capacità di lavoro. Ciò permise di includere nei

processi di analisi anche la **lussazione del cristallino**. La cosiddetta "stima del valore riproduttivo" è un metodo statistico col quale si cerca di descrivere il livello di ereditarietà di un animale. La genetica di un animale rafforza oppure indebolisce una determinata caratteristica? In questo contesto viene presa in esame non soltanto la caratteristica di un certo animale, bensì anche la stessa caratteristica presente in tutti i suoi parenti.

Mi ricordo quando ho fornito la prima lista di valori riproduttivi al presidente Adolf Schorn. Si trattava dell'altezza della spalla. Erano stati presi in esame la misura dell'animale e i valori relativi ai genitori e agli altri antenati e parenti quali zii, zie, fratelli, fratellastri e, se già presenti e analizzati, discendenti. Schorn considerò questi valori riproduttivi corretti. Essi erano in linea con le sue esperienze.

Era quindi giunto il momento di presentare dei valori riproduttivi che tenessero conto anche della **lussazione del cristallino**. Nel caso di un animale sano era quindi importante determinare se nella parentela ci fossero degli animali affetti dalla lussazione del cristallino. Con l'aumentare dei casi di lussazione del cristallino (LL) all'interno della linea o famiglia di un determinato cane e con l'accresciuto grado di parentela coi cani malati, aumentava anche la probabilità che l'animale fosse un portatore della predisposizione alla lussazione del cristallino.

Valori riproduttivi pari a 100 indicavano il rischio tipico della razza, mentre valori superiori a 100 erano un'esortazione alla prudenza (più il valore era alto e maggiore era il pericolo). Valori inferiori a 100 erano indice di basso rischio. Gli allevatori si orientarono ben presto secondo questi dati. **Il regolamento di allevamento fissava i limiti per gli accoppiamenti. All'interno della razza il rischio di lussazione del cristallino diminuiva di anno in anno e i casi di malattia calavano.** Si trattava di un momento particolarmente difficile, poiché il manifestarsi inaspettato di casi di lussazione del cristallino implicava spesso misure di selezione per interesse dinastie. La pubblicazione dei valori riproduttori creò una trasparenza che ha permesso un allevamento responsabile, benché difficile.

La stima dei valori riproduttivi mostrò che il riconoscimento di un caso di lussazione del cristallino si rivelava importante anche per i genitori. **Viste le conseguenze, bisognava accertarsi che il padre di un determinato cane fosse effettivamente il padre. Il Club si rivolse allo sperimentato controllo della discendenza attraverso l'esame del sangue.** Inizialmente si trattava di gruppi sanguinei / proteine del sangue. Si passò poi ad analisi del DNA. Attualmente approfittiamo di esami del DNA del passato. Grande importanza ha la possibile registrazione di tutti i casi di malattia. Fondamentale è stata l'introduzione di un certificato di garanzia e di un elevato contributo finanziario da parte della cassa solidale per i proprietari affetti dalla patologia.

Sulle tracce della lussazione del cristallino.

Sebbene tutto facesse pensare che nell'ereditarietà si trattasse di diversi geni interagenti, responsabili anche della diversa frequenza della lussazione del cristallino nelle generazioni seguenti, non si poteva escludere che l'azione determinante fosse riconducibile ad un solo gene principale.

Sotto la mia direzione, la signora Petra Scheler valutava nella sua tesi di laurea la possibilità di risolvere questo enigma. Ella utilizza il procedimento della probabilità di genotipo stimata (GGW). In questo processo si calcola con quale probabilità un animale può avere un genotipo "Sano", "Portatore di predisposizione alla malattia" o "Malato". "Sano" significa che esso ha ereditato da padre e madre il gene Normale. "Portatore di predisposizione alla malattia" è quel cane che ha ottenuto da un genitore un gene

normale e dall'altro un gene difettoso, ovvero mutato. "Malati" vengono considerati quegli animali che hanno ereditato sia dal padre che dalla madre il gene mutato. In quest'ultimo caso la lussazione del cristallino è "pre-programmata". **Nella sua tesi di laurea la signora Scheler è riuscita a dimostrare che un gene mutato svolge effettivamente un'azione principale e che altri geni insignificanti hanno a loro volta una certa influenza. Si ritiene che essi possano per esempio influenzare l'età in cui la patologia si manifesta. Senza il gene principale non può comunque esserci una lussazione del cristallino.**

Un confronto fra valori riproduttivi e probabilità di genotipo ha dimostrato che entrambi i procedimenti erano buoni. Si è quindi continuato con la stima dei valori riproduttivi. Col costante progresso di allevamento, vale a dire col ridursi dei casi di lussazione del cristallino, è aumentata l'importanza della probabilità di genotipo, la quale ha quindi sostituito la stima dei valori riproduttivi, venendo poi accolta nei procedimenti riproduttivi. Oggi analizziamo solamente i valori di probabilità di genotipo. Nel caso di un animale riproduttore, il valore indicante la probabilità di trasmettere il gene (valore P) non deve essere superiore allo 0,3, mentre il rischio per i cuccioli di un accoppiamento di ammalarsi di lussazione del cristallino non deve superare lo 0,02 (2%). Queste misure di prevenzione, fissate in un piano di allevamento per la lotta alla lussazione del cristallino, hanno rappresentato un enorme progresso nel mondo dell'allevamento. La figura n° 1 mostra che nel 1990 la frequenza del gene LL (responsabile della lussazione del cristallino) all'interno della popolazione canina si attestava ancora al 25%. Tale valore diminuì di anno in anno. Nel 2009 rappresentava soltanto più il 6,2%.

Cos'è la lussazione del cristallino?

In questo contesto è opportuno occuparsi ancora una volta della malattia nota come "lussazione del cristallino". Il cristallino si trova nell'occhio, dietro la pupilla, ed è appeso a dei fili sottilissimi. Questo apparato di sospensione, chiamato "zonulae" o "fili ciliari", serve da un lato al posizionamento del cristallino dietro la pupilla (o Blende, per utilizzare un termine ottico) e dall'altro alla messa in tensione o al rilascio del cristallino, il quale si assottiglia o si ispessisce. In questo modo viene regolata la messa a fuoco (figura n° 2).

Questi fili devono essere resistenti. Il gene mutato provoca però un indebolimento dei materiali. Con l'aumentare dell'età la tenuta diventa così debole che i sottili fili si strappano. Sovente bastano già dei lievi sforzi meccanici, come ad esempio l'abbaiare con forza. Quando i fili si strappano, il cristallino viene spinto dalla pressione del liquido della grossa cavità oculare posteriore attraverso la pupilla sino alla cavità oculare anteriore. Lì esso dà luogo a delle irritazioni. Inoltre, il deflusso del liquido oculare non avviene più correttamente. Attraverso i "fili ciliari" e la pupilla esso penetra nella cavità oculare anteriore da dove poi fuoriesce attraverso i pori situati agli angoli della cavità stessa. Ciò conduce ad un'elevata pressione oculare, ad un glaucoma, che può a sua volta provocare ingenti danni all'occhio e forti dolori per il cane. In rari casi il cristallino cade nella cavità oculare posteriore, il che è meno pericoloso. In assenza di glaucoma si può tentare di asportare il cristallino con un intervento chirurgico. Talvolta deve essere asportato l'intero occhio. Il dramma sta nel fatto che spesso subito dopo il primo occhio si ammala anche il secondo. Per il cane ciò rappresenta la fine di un periodo in cui la caccia era gioia e passione.

L'identificazione del gene.

La lussazione del cristallino colpisce anche l'uomo. Ciò mi ha dato la certezza che nel mondo della ricerca si fa di tutto per trovare il gene della patologia. Ho sempre sostenuto che bisognasse aspettare che la scienza facesse luce sul problema. Per questo motivo ho anche considerato la probabilità di genotipo una sorta di transizione verso l'analisi genetico-molecolare. **"Il successo arride a colui che sa aspettare". In**

effetti è quello che è accaduto. Nonostante l'assemblea generale del 2009 abbia deliberato di procedere alla ricerca del gene, non ce n'è stato bisogno. Nel settembre 2009, ancor prima che il Club del Deutscher Jagdterrier ricevesse dall'Istituto Veterinario di Hannover il piano di ricerca, due gruppi di ricercatori americani e inglesi hanno trovato quasi contemporaneamente il gene ed hanno proposto un test genetico. Siamo ora in grado di completare o di sostituire la probabilità di genotipo stimata con un'identificazione sicura del genotipo.

Il gene PLL (il gene della lussazione primaria del cristallino)

Nella letteratura specializzata la lussazione del cristallino viene indicata con **PLL (Primäre Linsenluxation = lussazione primaria del cristallino)**. Il gene normale viene indicato con N, il gene ereditato mutato con m. Anche noi adottiamo ora questa definizione. Nel test si appura se c'è soltanto il gene normale (PLL-N/N), se esiste sia un gene normale che uno mutato (PLL-N/m) o se vi sono solamente dei geni mutati (PLL-m/m). Nel secondo caso parliamo di portatori della predisposizione alla malattia, nel terzo di animali colpiti dalla patologia. Essi sono infatti già malati o possono ancora ammalarsi. **È interessante che i risultati della ricerca della signora Scheler sono stati confermati al 100%. La mutazione di PLL è decisiva. Nel gene si sono trovate anche altre mutazioni, le quali però, senza la mutazione principale, non portano alla lussazione del cristallino.**

Cosa fanno i geni?

Nel senso tradizionale, i geni sono dei ricettori di proteine fissati sulla sostanza ereditaria DNA. Le proteine sono formate da catene di aminoacidi. Il tipo e la sequenza degli aminoacidi vengono determinati dal tipo e dalla grandezza della proteina. Le proteine sono dei materiali da costruzione per il nostro corpo e dei componenti di sostanze che regolano le nostre funzioni vitali. Tutti i tessuti, gli ormoni, gli enzimi, ecc. sono oppure contengono delle proteine, la cui specificità è data da un piano di sviluppo. Il numero di aminoacidi e la sequenza nel concatenamento sono definite attraverso un gene attinente. Quando viene costituito un tessuto, degli "interruttori" localizzati nel DNA agiscono sui tessuti e su sostanze conduttrici. Il doppio cordone del DNA si apre e viene fatta una copia del gene. Questa è una molecola RNA. Tale copia contiene il modello costitutivo della proteina. Degli introni, paragonabili alle pause pubblicitarie in un telefilm, vengono quindi estratti dalla copia, mantenendo la capacità ricettiva per la proteina. Secondo gli esatti dettami della RNA, nei ribosomi della cellula vengono concatenati uno ad uno gli aminoacidi, fino ad ottenere la proteina. Se questa ricezione è sbagliata, per esempio a causa di una mutazione nel DNA, si crea una proteina sbagliata e sovente inefficace.

Nei fili ciliari si trova un'importante proteina (TJPI, Tight Junction Protein), che contribuisce ad assicurare la solidità delle fibre. Viene costituita attraverso un gene sul 3° cromosoma. Su questo gene è stata scoperta la mutazione responsabile della lussazione primaria del cristallino. Quando muta il gene?

La mutazione PLL è presente in quasi tutte le razze di terrier. È improbabile, se non addirittura escluso, che la stessa identica mutazione (ovvero un errore di copiatura) si verifichi due volte nello stesso punto in diversi animali o razze. Dobbiamo quindi supporre che qualche antichissimo terrier avesse questa mutazione. **Attraverso la creazione della razza e l'incrocio di diversi tipi di terrier, la mutazione si è estesa a quasi tutte le razze di terrier. Persino il Tibet-Terrier, che non è da considerarsi una razza terrier, ha ricevuto la mutazione in seguito ad un incrocio.**

Da dove proviene questa tara del Jagdterrier?

Dal Foxterrier o dai terrier inglesi che sono stati importati? Nessuno può più dirlo.

Il test genetico in laboratorio

Non voglio qui entrare nel dettaglio del test genetico. Me ne occuperò in seguito. In laboratorio viene analizzato il DNA. Se nel DNA non si trova alcuna mutazione, l'animale è del tipo N/N. Qualora si trova sia il modello del gene normale sia quello della mutazione, si è in presenza di un animale del tipo N/m, vale a dire di un portatore della predisposizione alla malattia. Se si trova solamente la mutazione, è presente il genotipo m/m. Abbiamo scelto circa 20 animali ed abbiamo mandato il loro DNA in laboratorio. Jagdterrier, che si erano ammalati di lussazione del cristallino, sono stati tutti riconosciuti come doppi portatori della mutazione (m/m). Genitori sani aventi della prole malata sono stati tutti identificati come portatori della predisposizione alla malattia (N/m). Sono stati presi in esame anche degli animali che, secondo la procedura di probabilità di genotipo, erano risultati sani. L'esame del DNA ha confermato tale risultato con un'unica eccezione: un cane maschio è risultato essere portatore della predisposizione alla malattia. Si trattava di un animale di importazione di cui si avevano poche informazioni riguardanti i suoi antenati. I suoi discendenti erano inoltre ancora troppo giovani per essere affetti dalla lussazione del cristallino. Ciò ha dimostrato l'affidabilità del test genetico.

Il test genetico funziona quindi anche per i Jagdterrier. Dovevamo esserne certi, poiché il Jadterrier non figurava tra le razze scelte per la ricerca. **Per sicurezza si sono mandati alcuni campioni in Inghilterra e negli Stati Uniti d'America. I risultati furono identici.**

La conseguenza

Bisogna innanzitutto affermare che il piano di allevamento, sinora valido, non è più adatto alla nuova situazione. Un tempo i portatori della predisposizione alla malattia erano sempre considerati come un rischio, perché non si sapeva se in fase di riproduzione essi venivano accoppiati con altri portatori della predisposizione alla malattia, non riconosciuti come tali. Oggi questi animali non spaventano più. Se vengono accoppiati con animali testati del genotipo N/N, il 50% dei cuccioli sarà sano (N/N) e il restante 50% sarà composto da portatori della predisposizione alla malattia. Nessuno dei giovani animali sarà però malato! Non c'è quindi più alcun motivo per escluderli dall'attività riproduttiva. Se un allevatore vuole scegliere da questa figliata un cucciolo da impiegare poi come riproduttore, può andare sul sicuro e riconoscere tramite il test genetico un cane del tipo N/N. Il fatto che intere dinastie sono state vittima della lotta alla lussazione del cristallino, appartiene ormai al passato.

Se il vecchio regolamento d'allevamento fosse ancora valido, dopo il test genetico una parte dei cani riproduttori verrebbe inutilmente allontanato dal processo riproduttivo. Uno dei nostri obiettivi è stato quello di evitare questo comportamento errato all'interno degli allevamenti. Il nuovo piano di allevamento per l'eliminazione della mutazione nelle razze canine prevede dei termini a partire dai quali possono essere impiegati nella riproduzione soltanto più dei cani assolutamente sani.

Questi termini sono obiettivi futuri, che ognuno può cercare di raggiungere in tempi più brevi. Ciò che è importante è il fatto che il piano di allevamento proteggerà, con l'aiuto del test genetico, gli acquirenti da delusioni e preoccupazioni e preserverà i cani dalla malattia e gli allevatori da rimproveri! Il piano di allevamento pretende ora un rischio di malattia pari a zero! Nello stesso tempo esso permette agli allevatori più libertà di rendere sicura la riproduzione, senza dover rinunciare alle particolarità e qualità venatorie.

Cosa ci aspettiamo?

Al momento siamo ben informati circa i rischi nella razza e, in fase di test genetico, possiamo quindi anche fare delle buone previsioni relative al numero di animali sani e a quello di portatori della predisposizione

alla malattia. Ciò dipende dalle annate che testiamo. **È chiaro che nel 1990, quando i geni mutati rappresentavano ancora il 25%, troviamo più portatori di predisposizione alla malattia che nel 2009, anno in cui il gene è presente soltanto più nel 6,5% dei casi.**

Nell'immagine n° 3 ho rappresentato graficamente l'aspettativa di avere animali sani. Negli ultimi anni essa ammonta a oltre l'80%, mentre nel 1990 era solo del 55%. Nel gruppo degli animali riproduttori, il numero di quelli sani è leggermente maggiore. Per ogni animale ci sono le probabilità di genotipo. Si tratta di tre cifre. La prima indica con che probabilità un animale è sano (N/N), la seconda indica con che probabilità l'animale è portatore di predisposizione alla malattia (N/m) e la terza indica con che probabilità l'animale ha il genotipo m/m, ovvero soltanto il gene mutato. Quest'ultima cifra indica quindi anche il rischio che il cane s'ammali.

Se le probabilità di genotipo sono ad esempio 0,5001 – 0,4822 – 0,0177, la probabilità di risultare sano al test genetico (prima cifra) ammonta a circa 0,5, vale a dire al 50%. Se al primo posto della probabilità di genotipo c'è 0,9700, le chance di avere un cane sano sono del 97%. Se lì c'è uno zero, dal test sicuramente non risulta "sano". In questo caso, infatti, il cane è portatore di predisposizione alla malattia o eventualmente affetto dalla patologia che non si è ancora manifestata.

Passato e futuro

Se ci occupiamo solamente dei cani attivi, ovvero impiegati nella riproduzione, e li testiamo, dobbiamo mandare in laboratorio il DNA di circa 1.000 animali. I costi ammontano a circa 50.000 Euro, ai quali bisogna aggiungere le spese per la preparazione del DNA degli antenati conservato presso altri laboratori. I costi sono difficilmente finanziabili. Bisognava quindi trovare altre strategie per rendere il progetto pagabile.

Se oggi testiamo un animale riproduttore attivo ed esso risulta sano, non possiamo tirare alcuna conclusione riguardante i suoi genitori. Animali sani possono discendere da due genitori sani, da una madre sana e da un portatore di predisposizione alla malattia, da un padre sano e da una portatrice di predisposizione alla malattia o addirittura da due portatori di predisposizione alla malattia. Non essendo in grado di fare alcuna precisa dichiarazione circa i genitori, non abbiamo certezze a riguardo degli altri discendenti dei genitori, vale a dire dei fratelli o fratellastri dell'animale testato. Tutti devono quindi essere sottoposti al test.

La situazione è diversa, se si comincia dagli animali più vecchi. Se un vecchio cane riproduttore e la sua compagna risultano entrambi sani, tutti i loro discendenti saranno sicuramente sani. Da dove proviene quindi il gene mutato, se il padre e la madre non lo possedevano?

Grazie a questo processo, non è più necessario testare gran parte degli animali. Abbiamo scelto questa strada, poiché i risparmi sembrano essere enormi. Ciò permette di caratterizzare il passato e di includervi gli attuali cani riproduttori. Questa strategia ha destato l'interesse scientifico e in questo progetto il Club approfitta ancora una volta di alcune analisi gratuite.

Non si può comunque evitare di testare parecchi animali, di cui non entrambi i genitori sono sani. Ci attende un periodo faticoso e pieno di lavoro, in cui il DNA deve essere preparato, selezionato ed analizzato nella giusta sequenza. Si tratta comunque di un'attività assai interessante. I vari elementi coinvolti, come ad esempio la centrale del DNA di Gießen oppure la banca dati online per i test genetici, rappresentano un passo nel futuro.

Interessante è il prossimo futuro non soltanto per gli allevatori, che poco a poco riceveranno delle chiare certezze dove sinora c'erano solo delle probabilità, bensì anche per i responsabili del Club, i quali ancora una volta saranno dei pionieri in grado di erigere delle pietre miliari nella cinologia.