

Test del DNA: una svolta nella diagnosi e nella prevenzione delle malattie ereditarie del cane e del gatto

RIASSUNTO

Oggi sono disponibili diversi test genetici per l'identificazione delle principali malattie ereditarie del cane e del gatto. Le tecniche diagnostiche basate sul DNA permettono di distinguere univocamente i soggetti malati o portatori delle patologie monogeniche d'interesse. Anche nel caso di patologie ad "insorgenza tardiva", cioè che si manifestano in età adulta, o a "penetranza incompleta", che si manifestano solo in una parte dei soggetti con il genotipo difettoso, con l'analisi del DNA è possibile l'identificazione precoce alla nascita del soggetto sano, malato o portatore. Nell'articolo vengono indicate le modalità di trasmissione e di prevenzione delle principali patologie ereditarie, ed alcuni risultati di prevalenza, relativi ai test del DNA effettuati presso il laboratorio Vetogene dell'Università degli Studi di Milano, al fine di promuovere efficaci programmi di selezione anche in Italia.

INTRODUZIONE

Le ricerche volte alla comprensione, a livello del DNA, dei principali disordini genetici che interessano molte tra le più diffuse razze canine e feline risultano di particolare interesse e attualità. Grazie alle nuove tecniche biomolecolari, soprattutto quelle per il sequenziamento del DNA¹, è stato possibile ottenere valide informazioni sul genoma che hanno già consentito il riconoscimento di numerose mutazioni geniche causative di diversi difetti ereditari. Sono quindi sempre più frequentemente disponibili test genetici, basati su tecniche di biologia molecolare, per l'identificazione di tali mutazioni nel cane e nel gatto².

Le tecniche diagnostiche a DNA permettono di distinguere in modo efficace i soggetti riproduttori responsabili della trasmissione ereditaria della patologia di interesse. Anche nel caso di malattie ereditarie ad "insorgenza tardiva", cioè che si manifestano in età adulta, è possibile l'identificazione precoce già alla nascita del soggetto sano, malato o portatore. Queste tecniche, congiuntamente all'identificazione molecolare del soggetto e all'analisi della parentela, aiutano efficacemente la selezione e costituiscono un utile strumento nella convalida dei dati genealogici. Le malattie ereditarie per le quali attualmente è possibile effettuare il controllo del DNA sono soprattutto: oculopatie, neuropatie, malattie metaboliche, cardiomiopatie, nefropatie e dermopatie.

Per questi test genetici esistono molti laboratori internazionali che offrono servizi di genotipizzazione (www.fsa-vet.it, <http://www.offa.org>). Attualmente i test riguardano soprattutto malattie ereditarie a trasmissione mendeliana semplice (autosomica dominante o recessiva); mentre per alcune forme a eredità più complessa, (malattie polifattoriali), come per esempio la displasia dell'anca, non esistono per ora diagnosi genetiche efficaci e certe. A tale proposito, ci sono risultati interessanti da studi che utilizzano le nuove tecnologie a *single nucleotide polymorphisms* (SNP), e che fanno sperare di poter identificare a breve, attraverso test predittivi, la presenza in un soggetto di un profilo di predisposizione al difetto³.

È importante per i medici veterinari, spiegare agli allevatori che i test del DNA possono, se ben utilizzati, aiutare a "gestire" la malattia in allevamento con strategie da un lato volte a favorire, per le malattie autosomiche recessive (Tab. 1), gli accoppiamenti tra sani o tra sani e portatori (in modo da eliminare progressivamente i soggetti malati e portatori senza ridurre la variabilità genetica della razza) e dall'altro, per le autosomiche dominanti, a orientare obbligatoriamente o molto preferenzialmente verso l'accoppiamento tra soggetti sani (Tab. 2).

Il laboratorio Vetogene, dell'Università degli Studi di Milano, svolge ormai da diversi anni alcuni test diagnostici per le malattie ereditarie del cane e del gatto, sia presso la sede di Milano, sia come *partner* del laboratorio statunitense *Optigen* e del laboratorio francese *Antagene*.

**S.P. Marelli¹, J. Riva², A. Picchi²,
A. Gessi², E. Moretti², S. Filippone²,
M. Baldini², M. Longeri¹, M. Polli¹**

¹ DIVET-Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità
Pubblica, Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano,
Vetogene-Lab. - Via Celoria, 10 - 20133 Milano

² Laboratorio Vetogene, Spin Off Università di Milano,
Viale Ortles, 22/4 - 20139 Milano

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 12/03/2014 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 02/04/2014".

TABELLA 1
Accoppiamenti consigliati nelle forme autosomiche recessive

Genitori	Figli	Accoppiamento
Sano x sano	Tutti sani	SI
Sano x portatore	50% sani e 50% portatori	SI
Portatore x portatore	25% sani, 50% portatori, 25% malati	NO
Portatore x malato	50% portatori, 50% malati	NO
Malato x malato	Tutti malati	NO

TABELLA 2
Accoppiamenti consigliati nelle forme autosomiche dominanti

Genitori	Figli	Accoppiamento
Sano x sano	Tutti sani	SI
Sano x malato	50% sani e 50% malati	NO

Lo scopo del presente articolo è quello di fornire dati di prevalenza in Italia per alcune delle più importanti malattie ereditarie, qui sotto riportate, e su cui Vetogene svolge un'efficace azione di controllo.

Nel cane:

- Epidermolisi Bollosa Giunzionale-JEB
- Cistinuria
- Atrofia Progressiva della Retina-PRA
- Mielopatia Degenerativa-MD
- Collie Eye Anomaly-CEA

Nel gatto:

- Malattia Policistica Renale-PKD
- Cardiomiopatia Ipertrofica-HCM

Epidermolisi bollosa giunzionale (JEB) nel bracco tedesco

L'epidermolisi bollosa è una malattia ereditaria a carattere autosomico recessivo. La causa è una mutazione semplice in un solo gene (LAMA3)⁴. Questa alterazione determina l'espressione di una proteina difettosa a livello cutaneo (laminina 332) e i soggetti malati muoiono durante le prime settimane di vita, prevalentemente per le conseguenze delle lesioni agli arti. Il cane da ferma tedesco a pelo corto (Kurzhaar) è sicuramente la razza più colpita e altre razze interessate dalla patologia sono il Langhaar e il Drahthaar. Le ricerche eseguite finora hanno consentito la messa a punto di un efficace test diagnostico per l'identificazione di soggetti sani, portatori e malati⁵⁻⁶.

Cistinuria nel cane di razza Terranova

L'accumulo dell'amminoacido cistina nelle urine corrisponde in alcune razze canine ad una calcolosi ereditaria. La cistina, se eliminata in grande concentrazione, può provocare la formazione di agglomerati, cristalli o calcoli urinari che si posso-

no localizzare a livello renale o nella vescica. È una forma autosomica recessiva a insorgenza tardiva (tra i 3 e i 6 anni d'età) in cui la mutazione causativa, nel gene SLC3A1⁷, si evidenzia clinicamente solo negli individui omozigoti. Il test a DNA oggi disponibile presso il laboratorio Vetogene, permette il riconoscimento precoce di tutti i soggetti sani, portatori e malati a qualsiasi età, permettendo di selezionare consapevolmente i soggetti già alla nascita.

Atrofia progressiva della retina

L'Atrofia Progressiva della Retina (PRA) è un termine generico per indicare differenti patologie ereditarie a carico della retina che differiscono in base al fotorecettore colpito (coni o bastoncelli)¹⁴, alla razza considerata, all'età d'insorgenza e alla progressione della malattia. Si tratta di disordini della retina progressivi razza-specifici ed eterogenei sia dal punto di vista fenotipico che genotipico^{8,9,10,11,12,13}. Nel cane la morfogenesi dei fotorecettori retinici è incompleta alla nascita; questo presupposto è molto importante ai fini della classificazione della malattia che è come segue:

- Displasia dei coni e dei bastoncelli: disordine di sviluppo che si esprime a livello cellulare nel periodo postnatale.
- Degenerazione dei coni e dei bastoncelli: disordine degenerativo che si verifica quando la maturazione funzionale è stata raggiunta.

La PRA è stata suddivisa in due distinti gruppi di malattie: PRA precoci (*early-onset*) e PRA tardive (*late-onset*).

Ciascun gruppo contiene numerose varianti con caratteristiche peculiari (Tab. 3). La trasmissione della PRA è quasi sempre autosomica recessiva. Esistono anche una forma autosomica dominante (D-PRA) ed una legata al cromosoma X (*X-linked* PRA). Tutte le forme portano a una progressiva

TABELLA 3
Classificazione dell'Atrofia Progressiva della Retina in relazione al "locus" coinvolto e alla razza canina colpita

Malattia	Razza	Locus
Rod-Cone Dysplasia 1, rcd1 ¹⁷ , rcd1a	Irish e Red e White Setter, Sloughi	PDE6B Rho c11 C>G
Rod-Cone Dysplasia 2, rcd2 ¹⁸	Collie	RD3
Rod-Cone Dysplasia 3, rcd3 ¹⁹	Cardigan Welsh Corgi	PDE6A
Rod-Cone Dysplasia 4, rcd4 ²⁰	English Setter, Gordon Setter, Irish Setter	C2 orf71c.3149_3150insC
Early Retinal Degeneration, erd ²¹	Norwegian Elkhound	STK38L/NDR2 c186ins229bp, 15bp dup
Photoreceptor dysplasia, pd ²²	Miniature Schnauzer	
Cone-Rod Dystrophy, crd1 ²³	American Staffordshire Dachshund	ABCA4 in American Staffordshire NPHP4 in Dachshund
Cone-Rod Dystrophy, crd2 ²³	American Pit Bull Terrier	IQCBI
Cone-Rod Dystrophy, crd1/crd4 ²⁴	Dachshund English Springer Spaniel Papillon, Phalene	RPGRIP1
Cone-Rod Dystrophy, crd3 ²⁵	Glen of Imaal Terrier	ADAM9 c.1592_1881 del
Progressive Rod-Cone Degeneration, prcd ²⁶	Molte razze	CFA09 c52 G>A
x-Linked, XL ²⁷	Siberian Husky, Samoiedo	RPGR
Autosomal Dominant, AD ²⁸	English Mastiff, Bullmastiff, Old English Mastiff	Rho
Cone-Rod Dystrophy, SWD ²⁹	Dachshund miniature, standard wire-haired	NPHP4 180dp deletion in exon/intron 5
GR_PRA1 ³⁰	Golden Retriever	SLC4A3 2601_2602 insC
GR_PRA2 ³¹	Golden Retriever	TTC8c699delA
Generalized, g ³²	Schapendoes	CCAC66c521_522 insA
PRA1 ³³	Papillon	
Adult-onset ³⁴	Basenji	SAGc1216T>C

perdita della vista fino alla cecità completa. I progressi in ambito genetico hanno consentito d'identificare la maggior parte dei geni responsabili delle varie forme di PRA e, di conseguenza, di sviluppare test genetici diagnostici di facile applicabilità, di elevata affidabilità ed a costi contenuti^{15,16}.

Mielopatia Degenerativa

La Mielopatia Degenerativa (MD) è una malattia neurodegenerativa su base ereditaria, autosomica recessiva a penetranza incompleta. È una patologia ad insorgenza tardiva che colpisce tendenzialmente i soggetti tra 8 e 14 anni d'età^{35,37}. I sintomi sono debolezza al treno posteriore, progressiva perdita della coordinazione muscolare e della sensibilità propriocettiva degli arti posteriori. Lo sviluppo della malattia è ascendente fino alla tetraplegia per la degenerazione dei motoneuroni superiori. Presente in molte razze, descritta per la prima volta nel 1973 nel Pastore Tedesco, ad oggi molti studi hanno evidenziato la stessa patologia in: Barbone Nano, Barbone Grande, Borzoi, Bovaro del Bernese, Boxer, Cane da Lupo Cecoslovacco, Chesapeake Bay Retriever, Hovawart, Pastore Bianco Svizzero, Rhodesian Ridgeback, Cardigan e Pembroke Welsh Corgi, Siberian Husky e anche nei meticci. Inoltre è stata diagnosticata, senza la con-

ferma istopatologica, in: Alano, Irish Terrier, Kerry Blue Terrier, Labrador Retriever, Kuvasz, Collie (Smooth e Rough), Pastore Belga, Schnauzer Gigante, Soft-coated Weathen Terrier, Golden Retriever, Wire Fox Terrier, American Eskimo Dog, Carlino e Mastiff^{35,37}. Nel 2009 è stata identificata la mutazione E40K sulla sequenza del gene *SOD1* (*Super Oxide Dismutase 1*) la cui espressione nei soggetti omozigoti recessivi costituisce il fattore principale, per l'insorgenza della patologia^{35,36,37}. La funzione della SOD è quella di convertire i radicali superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare. La mutazione causa un'alterazione nella struttura e della funzionalità dell'enzima rendendolo incapace di difendere il motoneurone dall'azione dei radicali^{35,37}.

Per la diagnosi esiste un test genetico che identifica la mutazione E40K.

CEA (Collie Eye Anomaly)

La *Collie Eye Anomaly* è un'oculopatia su base ereditaria autosomica recessiva non progressiva.

La CEA può essere diagnosticata, con una visita oculistica già a 5-10 settimane d'età. Le razze più colpite sono le razze Collie (Smooth e Rough Collie, Border Collie e Shetland Sheepdog), ma è stata diagnosticata anche in: Beagle, Bassotto Tede-

sco, Pastore Tedesco, Barbone Toy e Miniature, Australian Shepherd, Lancashire Heeler, Hokkaido Dog, Siberian Husky, Nova Scotia Duck Tolling Retriever, Boykin Spaniel, Longhaired Whippet, Silken Windhound e nei meticci^{38,39}.

La CEA^{38,39} è un disordine ereditario complesso che colpisce il fundus oculi-retina, la coroide, la sclera, il tapetum e le terminazioni del nervo ottico. Pur essendo classificata come causata da un'unica singola mutazione, nelle diverse razze Collie si presenta con un'elevata variabilità per tipo e gravità clinica³⁸. Si identificano tre principali segni clinici a diversa localizzazione e con diversa severità: la più frequente è la Displasia Corioretinale (CRD) o Ipoplasi Coroidale (CH), che risulta in un'area pallida visibile nel fundus lateralmente al disco ottico, dovuta all'assenza di pigmento nella retina e/o coroide. Più grave, anche se meno frequente, è il Coloboma, mentre l'alterazione più severa è il distacco retinico.

Le modificazioni vascolari sono un altro reperto riscontrabile nella CEA e si presentano come aumento della tortuosità delle vene o come ifema.

La mutazione causativa della CEA è una delezione intronica di 7799 bp nel gene NHEJ1 localizzato sul cromosoma 37⁴⁰, rilevabile con un test genetico che permette di distinguere un soggetto in sano, portatore e malato.

La malattia policistica renale del gatto (PKD)

La malattia policistica renale (PKD), o malattia del rene policistico, è una malattia ereditaria caratterizzata da cisti renali bilaterali congenite che possono raggiungere anche i 2,5 cm di diametro ciascuna e le 20-200 unità. La razza più colpita in cui è stata identificata la mutazione causativa nel gene PKD1⁴² è il Persiano/Esotico, ma la mutazione può trovarsi anche in soggetti di altre razze, in cui ci siano stati outcross con la razza persiana: Himalayan, American Shorthair, Scottish Fold Ragdoll e British Shorthair e, molto più occasionalmente, Selkirk Rex, Sacro di Birmania, Ragdoll, American Shorthair, Devon Rex, Maine Coon, Norvegese delle Foreste, Sphynx, Orientale, Cornish Rex, Abissino/Somalo, Manx e Burmese. La trasmissione genetica del difetto è di tipo autosomico dominante, quindi il gatto può essere sano (omozigote

recessivo) o malato (eterozigote), mentre i soggetti omozigoti dominanti in genere non vengono alla luce in quanto probabilmente vengono riassorbiti allo stadio embrionale. È disponibile un test genetico molto affidabile nelle razze indicate che identifica, potenzialmente già alla nascita, la mutazione causativa, e aiuta la diagnosi ecocardiografica, difficile per le piccole dimensioni delle cisti a pochi mesi d'età⁴⁴.

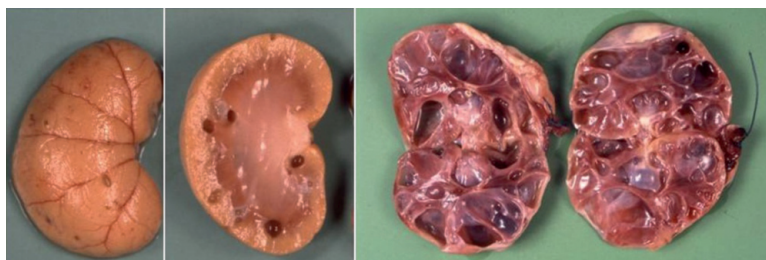
La cardiomiopatia ipertrofica felina (HCM)

La cardiomiopatia ipertrofica (HCM) è la più comune malattia cardiaca del gatto e dell'uomo e costituisce un complesso di disordini cardiovascolari caratterizzato da marcata eterogeneità genetica e clinica.

È anch'essa una malattia ereditaria autosomica classificata come dominante⁴⁵ e ad "insorgenza tardiva" ma, a differenza di PKD, ha penetranza incompleta ed espressività variabile. La causa genetica è presente fin dal concepimento e può essere trasmessa alla prole, ma i sintomi si manifestano diverso tempo dopo la nascita. I gatti affetti da HCM solitamente non danno segni visibili della patologia fino all'età di 18-24 mesi, con grande variabilità nella gravità e nei tempi d'insorgenza, solo parzialmente riconducibili all'assetto genetico patologico (omozigote o eterozigote per la mutazione), al sesso, al peso etc. La forma clinica conclamata si presenta in età adulta, raramente prima dei 2-3 anni di vita. La principale manifestazione di HCM è l'ispessimento della parete ventricolare sinistra e/o dei muscoli papillari con la riduzione della cavità ventricolare e della gittata cardiaca. I sintomi variano dall'assenza di sintomi fino, nei casi più gravi, a morte improvvisa. È stata identificata una mutazione (A31P) nel gene Myosin Binding Protein C3 nel Maine Coon (MCO)⁴⁶. Nello stesso gene, ma in un codone diverso, è stata identificata una seconda mutazione (R820W) causativa nel Ragdoll⁴⁷. Una terza variazione (A74T), sempre nello stesso gene, è stata segnalata come possibile causativa di HCM del MCO⁴⁸ e viene proposta da diversi laboratori come test genetico per la malattia. Tuttavia per il momento non ci sono evidenze scientifiche che dimostrino, o anche solo fortemente indichino, che tale variante sia causativa della malattia⁴⁹. Esistono inoltre forme di HCM sicuramente a base ereditaria in linee di sangue di altre razze, quali il Siberiano e lo Sphynx, che non sono associate alle mutazioni suddette e di cui sono ancora ignote le cause molecolari.

MATERIALI E METODI

In tutte le analisi effettuate per le differenti malattie il prelievo del materiale biologico è avvenuto prevalentemente da sangue in EDTA. L'estrazione



Rene policistico. Per gentile concessione Prof. Sironi - UNIMI.

del DNA è avvenuta secondo il metodo *GE Healthcare* (codes: 28-9042-64/65).

Epidermolisi bollosa giunzionale (JEB)

È stato allestito un protocollo di PCR (*Polymerase Chain Reaction*) allele-specifica per l'amplificazione dell'allele "sano" e dell'allele "mutato" (Gene LA-MA3). La metodica di *screening* della mutazione è coperta da brevetto da parte del laboratorio Vetogene, che dal 2007 ha verificato complessivamente 694 soggetti di razza Cane da ferma Tedesco a pelo corto (Kurzhaar).

Cistinuria nel cane di razza Terranova

Il protocollo prevede l'identificazione di una mutazione nella posizione 111 dell'esone 2 del gene SLC3A1⁵. Attraverso la metodica che utilizza PCR ed enzimi di restrizione, vengono prodotti dei frammenti di DNA di differente grandezza che permettono il riconoscimento degli alleli. Per questa forma ereditaria dal 2008, sono stati controllati complessivamente 71 cani Terranova appartenenti ai principali allevamenti presenti sul territorio nazionale.

Atrofia progressiva della retina

In collaborazione con il laboratorio *Optigen*, che detiene i brevetti internazionali delle mutazioni causative, si è proceduto al controllo delle mutazioni per diverse forme della malattia (Tab. 3) su 172 cani di diversa razza provenienti da differenti allevamenti del territorio nazionale (Tab. 4).

Mielopatia degenerativa

È stato utilizzato un test che prevede sequenziamento diretto di un amplicone di 294pb per la ricerca della mutazione E40K dell'esone 2 del gene SOD1, una transizione G>A in posizione 118³⁵. Dal 2012 sono stati genotipizzati 203 cani di diverse razze (Tab. 4).

CEA (Collie Eye Anomaly)

Nell'ambito del presente lavoro, in collaborazione con il laboratorio *Optigen*, si è proceduto al controllo del gene coinvolto nella malattia, mediante il riconoscimento della delezione intronica di 7799 bp (gene NHEJ1 sul cromosoma 37) secondo la metodica soggetta a brevetto internazionale. Sono stati analizzati 200 cani di diversa razza provenienti da allevamenti del territorio nazionale (Tab. 4).

La Malattia Policistica Renale del gatto (PKD)

Sono stati analizzati 1077 soggetti appartenenti a diverse razze feline diffuse in Italia (Tab. 5). I soggetti maggiormente controllati appartengono in ordine decrescente alle seguenti razze feline: Persiani 476, Exotic shorthair 191, MCO 125, Ragdoll

TABELLA 4

Soggetti analizzati presso il laboratorio Vetogene, appartenenti a differenti razze canine per Atrofia Progressiva della Retina, Collie Eye Anomaly e Mielopatia Degenerativa

PRA- ATROFIA PROGRESSIVA DELLA RETINA	N° soggetti
AUSTRALIAN CATTLED OG	41
AUSTRALIAN SHEPHERD	11
CHINESE CRESTED DOG	2
COCKER SPANIEL	5
DWARF POODLE	20
ENTLEBUCHER MOUNTAIN DOG	8
FINNISH LAPPHUND	1
GOLDEN RETRIEVER	16
IRISH SETTER	1
LABRADOR RETRIEVER	34
MINIATURE SCHNAUZER	18
NOVA SCOTIA D.TOLLING RETRIEVER	10
PORTUGUESE WATER DOGS	3
SIBERIAN HUSKY	1
OLD ENGLISH MASTIFF	1
TOTALE	172
MIELOPATIA DEGENERATIVA	N° soggetti
BORZOI	7
BOVARO DEL BERNESE	10
CANE DA LUPO CECOSLOVACCO	83
ROUGH COLLIE	1
COCKER SPANIEL INGLESE	1
HOVAWART	38
CANE DA LUPO SAARLOOS	1
METICCIO	5
PASTORE SVIZZERO BIANCO	10
PASTORE TEDESCO	23
PITBULL	1
ROHODESIAN RIDGEBACK	10
WELSH CORGI PEMBROKE	13
TOTALE	203
CEA- COLLIE EYE ANOMALY	N° soggetti
AUSTRALIAN SHEPHERD	11
BORDER COLLIE	151
NOVA SCOTIA D.TOLLING RETRIEVER	14
SHETLAND SHEEPDOG	21
COLLIE	3
TOTALE	200

97, British Shorthair 95 oltre ad altre razze meno diffuse e al Comune Europeo.

È stata utilizzata la metodica pubblicata dal gruppo della Prof. Lyons⁴³ per lo *screening* della mutazione causativa nell'esone 29 del gene PKD1.

La cardiomiopatia ipertrofica felina (HCM)

Il test a sequenziamento diretto ha previsto l'identificazione delle mutazioni C>G (A31P), C>T (R80W) e del polimorfismo G-A (A74T) del gene MYBPC 3, come descritto in bibliografia^{45,46,47}.

TABELLA 5

Numerosità, genotipo (N/N = omozigote normale; N/MUT = positivo eterozigote normale/mutato) e % di genotipi positivi (% N/MUT) dei soggetti sottoposti al test PKDI divisi per razza. Nelle razze con numerosità totale molto bassa (inferiore ai 50 test), non è stata calcolata la percentuale dei genotipi positivi perché di dubbia informatività (Dati Vetogene - Spin-off Università degli Studi di Milano, 2014)

Razza	Tot	N/N	N/MUT	% N/MUT
Persiano	477	347	130	27
Exotic	191	140	51	27
Certosino	15	11	4	nc
Scottish fold	16	14	2	nc
Devon Rex	1		1	nc
Colourpoint	3	2	1	nc
Main Coon	125	125	0	0
Ragdoll	97	97	0	0
BSH	95	95	0	0
Siberiano	39	39	0	nc
Sacro di B.	8	8	0	nc
Bengala	4	4	0	nc
Comune Europeo	3	3	0	nc
Norvegese	2	2	0	nc
Blu Russia	1	1	0	nc
Tot. Test	1077	888	189	nc

Complessivamente la campionatura è stata di 2826 gatti appartenenti a dodici razze oltre ad alcuni comuni europei. Le razze maggiormente analizzate sono state quelle più colpite da HCM e per cui esistono i test specifici: MCO (con 2189 soggetti) e Ragdoll (294) (Tab. 6).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Per Epidermolisi Bollosa Giunzionale nel Bracco Tedesco l'analisi del DNA effettuata ha permesso di riconoscere i soggetti portatori, sani e malati, rendendo possibile la predisposizione di programmi selettivi. Attualmente sul totale dei riproduttori di razza Kurzhaar controllati in Italia presso il laboratorio Vetogene (Grafico 1) la prevalenza dei portatori è risultata del 23,9%. Su 694 soggetti analizzati solo 6 sono risultati malati, mentre sono stati identificati 133 portatori.

Per quanto riguarda la Cistinuria in 71 soggetti controllati di razza Terranova sono stati identificati 33 portatori. Non è stato riconosciuto nessun malato (Grafico 2).

Per l'Atrofia Progressiva della Retina (Grafico 3), le razze con il maggior numero di soggetti analizzati sono l'Australian Cattle Dog (34,1%), il Labrador Retriever (29,4%), il Barbone nano (40%), il Golden Retriever (8%) e lo Schnauzer nano. Nessuno Schnauzer nano è risultato portatore. Anche in questo caso, come per altre malattie esaminate, il numero degli omozigoti mutati è irrilevante.

TABELLA 6

Numerosità dei test, frequenze alleliche in % di A31P, R820W e A74T (MUT = allele mutato, N = allele normale) dei soggetti sottoposti al test per HCM divisi per razza (Dati Vetogene - Spin-off Università degli Studi di Milano, 2014)

Razza	Tot Test	Freq all in %					
		A31P		A74T		R820W	
		MUT	Norm	A	T	MUT	Norm
Bengala	17		24				53
BSH	38		42	9	12		29
Certosino	3		67				33
Comune Europeo	7		29				43
Devon Rex	3		33				33
Main Coon	2189	10	47	3	11		26
Norvegese	68		32		22		37
Persiano	9		33		22		33
Ragdoll	294		10	2	6	14	68
Sacro di B.	31		29	8	15		29
Scottish fold	33		100				
Siberiano	113		27	8	17		46
Sphinx	21		33	10			52
Totale Test	2826						

La Mielopatia Degenerativa è stata analizzata prevalentemente nelle razze derivate dal Pastore Tedesco per le quali si è assistito ad una maggior richiesta di controllo (Grafico 4). In particolare le razze che presentano un numero elevato di portatori sono soprattutto Pastore Tedesco (30,4%), Hovawart (31,5%), Cane da Lupo Cecoslovacco (38,5%) (Grafico 4). Da rilevare che qui gli omozigoti mutati sono in numero particolarmente elevato per le razze Hovawart e Welsh Corgi Pembroke.

Riguardo la CEA la razza sottoposta a maggior controllo dagli allevatori è il Border Collie (Tab. 4, Grafico 5), con percentuale di portatori del 30,4%. Nelle altre razze l'esigua numerosità non permette considerazioni di rilievo. Va tuttavia segnalato che nella razza Shetland Sheepdog, pur sui pochi controlli effettuati, il numero dei portatori è superiore a quello dei soggetti sani. Come già visto per le altre malattie, anche in questo caso si rileva un esiguo numero di malati/omozigoti mutati rispetto ai portatori, soprattutto nel Border Collie (Grafico 5).

Nel gatto, per la Malattia Policistica Renale, i controlli del DNA eseguiti mostrano la presenza di soggetti malati (eterozigoti) soprattutto in 2 razze feline particolarmente diffuse in Italia: il Persiano 27,2% e l'Exotic 26,7%. Nelle altre razze considerate aventi una numerosità più consistente di test (superiore alle 50 unità) come il MCO, il Ragdoll e il British Shorthair non si è registrata nessuna positività alla mutazione causativa. Da segnalare invece che razze meno controllate dagli allevatori, come Certosino, Scottish Fold, Devon Rex e Colourpoint, hanno mostrato alcuni soggetti positivi al test del DNA per la mutazione PKD1 del Persiano (Tab. 5). Nei casi di razze diverse dal Persiano/Esotico la presenza della mutazione si spiega

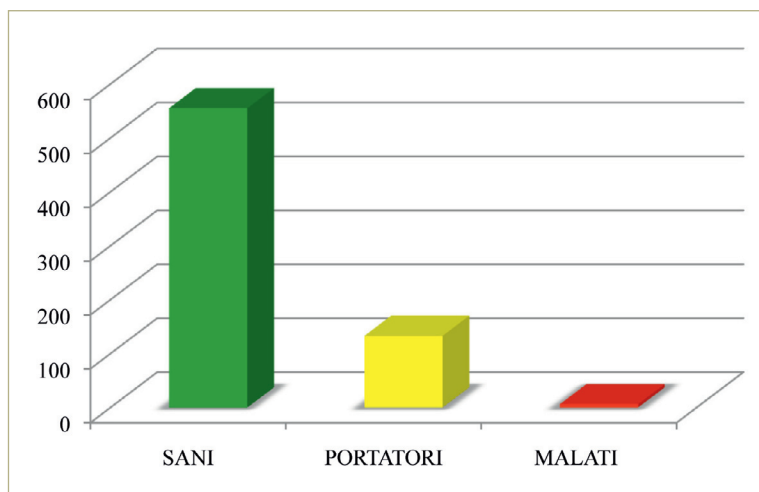


GRAFICO 1 - Epidermolisi Bollosa Giunzionale (JEB). Cani sani (N/N), malati (P/P) e portatori (N/P) riscontrati nella popolazione italiana presso il laboratorio Vetogene. In ordinata la numerosità.

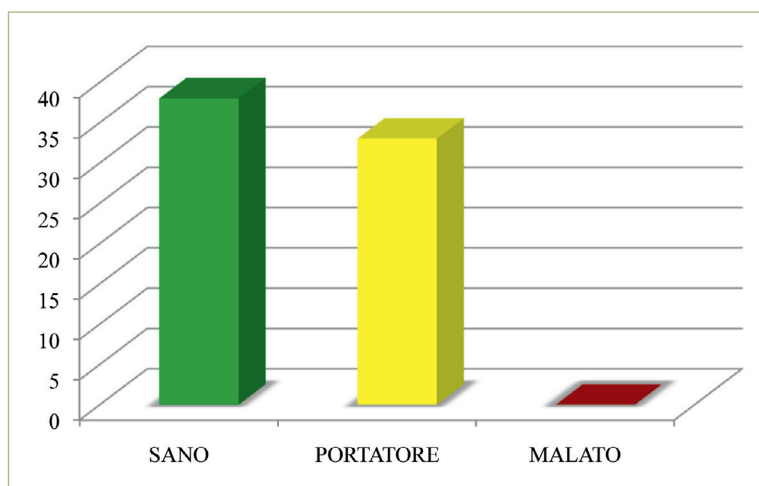


GRAFICO 2 - Cistinuria nel cane Terranova, soggetti sani, malati e portatori riscontrati nella popolazione italiana. In ordinata la numerosità.

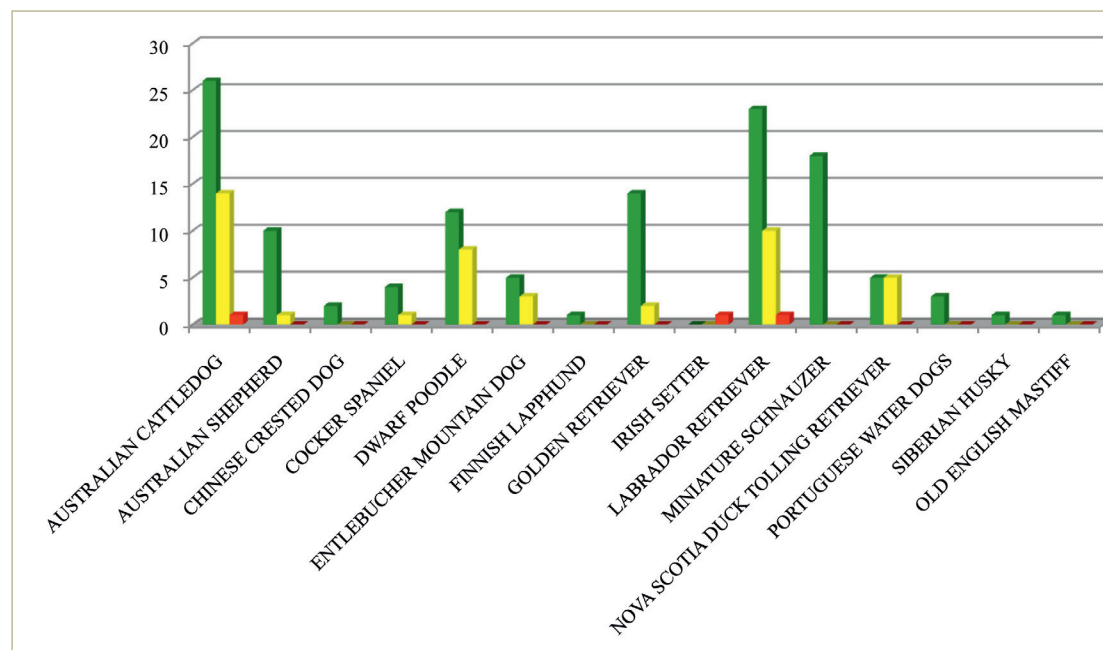


GRAFICO 3 Atrofia progressiva della retina: le razze analizzate con un maggior numero di portatori sono il Labrador Retriever, il Golden Retriever e l'Australian Cattle Dog. In verde i soggetti sani, in giallo i portatori e in rosso i soggetti malati. In ordinata la numerosità.

GRAFICO 4
Mielopatia
degenerativa in alcune
razze controllate
con il test del DNA
presso il laboratorio
Vetogene.
In ordinata
la numerosità.

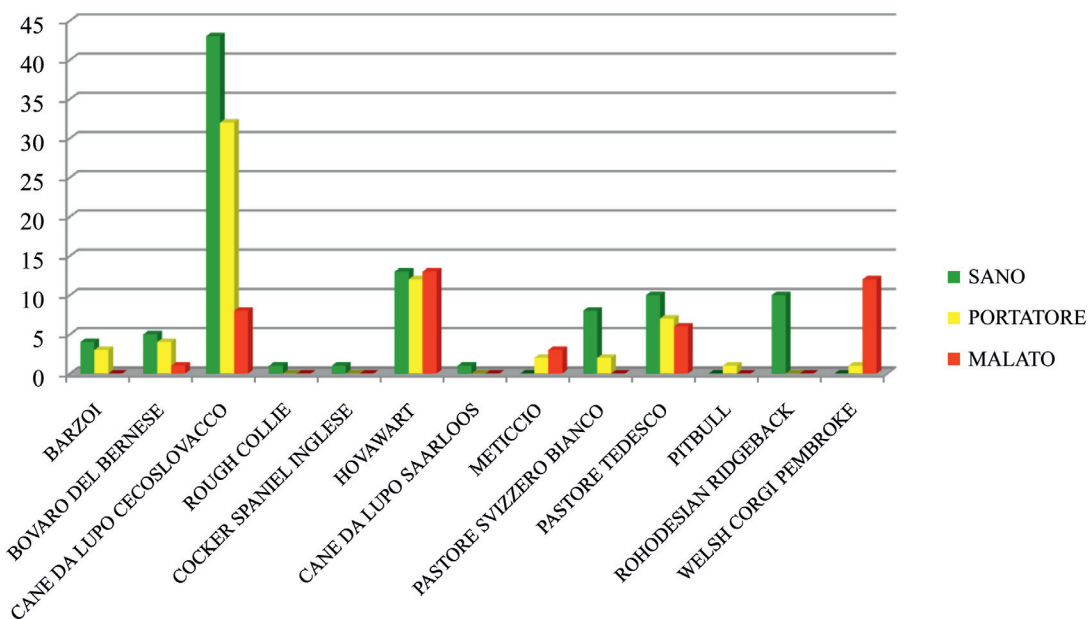
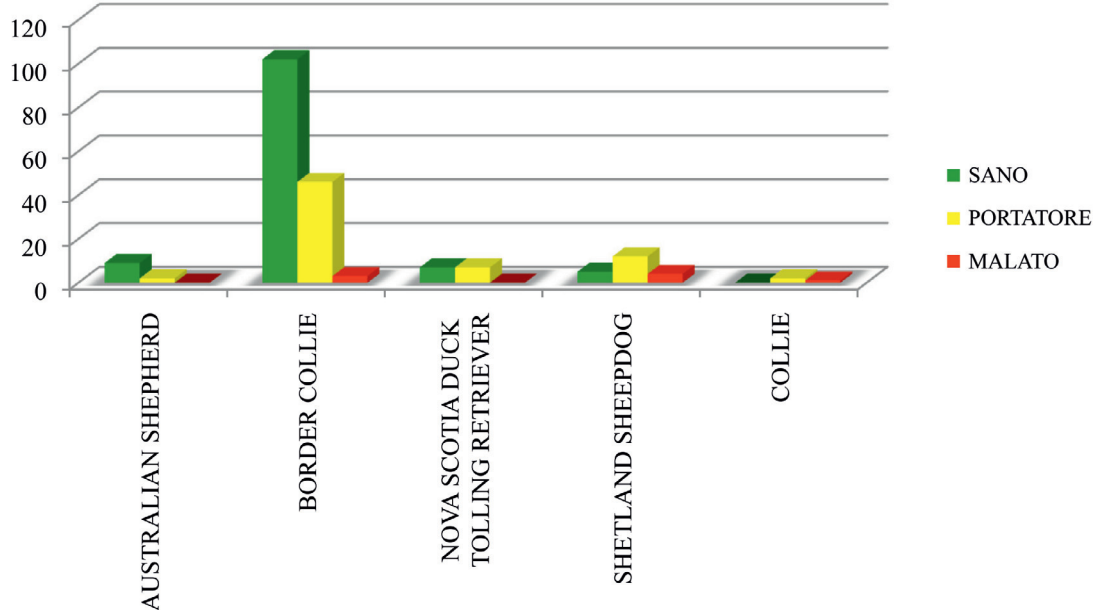


GRAFICO 5
Cea (*Collie Eye*
Anomaly) Cani sani
(N/N), malati (P/P)
e portatori (N/P)
riscontrati nella
popolazione italiana
presso il laboratorio
Vetogene.
In ordinata
la numerosità.



con la provenienza di questi soggetti da incroci, più o meno recenti, voluti o accidentali, con gatti Persiani o Esotici. Su oltre 1000 soggetti testati e allevati in Italia in questi anni si è riscontrata una positività media al test del 18%, percentuale che sale anche oltre il 27% nell'Esotico/Persiano, in leggera flessione negli ultimi anni, ma ancora molto alta per una malattia ereditaria. È importante ricordare che il test genetico PKDI non fornisce alcuna informazione sulla dimensione o sul numero delle cisti presenti in un soggetto, ma rileva solo la presenza della mutazione causativa, non è dunque predittiva sui modi e tempi di sviluppo della malattia, che deve quindi essere valutata in sede di visita clinica.

Per quanto riguarda l'HCM, tra tutti i gatti pervenuti, nati ed allevati in Italia e in parte in Ticino, gli unici che hanno registrato positività alle specifiche mutazioni causative di HCM delle razze Ragdoll (R820W) e MCO (A31P) sono proprio i soggetti di queste razze. Nel MCO la frequenza allelica di A31P è stata del 10%, con un 3% di omozigoti mutati e un 15% di eterozigoti⁵¹. Nel Ragdoll, la cui campionatura è stata però decisamente più ridotta rispetto a quella del MCO, la frequenza allelica di R820W è stata del 14%, con un 2% di omozigoti mutati e un 23% di eterozigoti. I gatti delle altre razze, pur essendo in diversi casi colpiti da Cardiomiopatia ipertrofica clinica (dati non mostrati),

non sono mai risultati positivi alle due mutazioni causative, confermando la specificità di razza di tali mutazioni e la bassissima, se non assente, derivazione da outcrossing dei soggetti campionati di queste razze. La variante A74T è risultata presente in entrambe le forme alleliche note in 5 razze, mentre in Norvegese e Persiano è stata registrata solo la variante T e in Sphynx solo la A. Non risulta dunque essere un polimorfismo di razza e, fin'ora non pare significativamente associata allo sviluppo della malattia⁴⁹ (Tab. 6). L'alta percentuale di alleli mutati, A31P e R820W nella popolazione mondiale (i valori oscillano indicativamente tra il 20 e il 40%), la penetranza incompleta e l'espressività variabile della malattia, hanno sconsigliato l'eliminazione dalla riproduzione di tutti i soggetti eterozigoti per evitare una forte riduzione del pool genetico, con gravi conseguenze in termini di aumento della consanguineità, perdita di caratteri genetici favorevoli ed espressione di geni recessivi sfavorevoli.

Nel marzo del 2008, per sopperire alla carenza di coordinamento tra allevatori, veterinari e genetisti, è stato costituito l'Osservatorio Italiano HCM felina^{49,50}. L'organizzazione coinvolge il Maine Coon Club Italiano e altre associazioni di razza associate ad ANFI, lo Spin-off Vetogene dell'Università di Milano, professori delle Università di Milano, Perugia e Napoli e specialisti clinici liberi professionisti. I principali obiettivi dell'Osservatorio sono il monitoraggio della prevalenza dell'HCM sul territorio italiano, il supporto scientifico agli allevatori nella scelta selettiva, l'istituzione di una banca biologica e di un database per ulteriori studi scientifici e la creazione, per la prima volta in Italia, di un punto di contatto operativo tra allevatori, veterinari e comunità scientifica.

I risultati ottenuti nelle malattie ereditarie canine e feline considerate, mostrano una consistente numerosità di soggetti eterozigoti nelle forme autosomiche sia dominanti che recessive e in generale un'alta frequenza di alleli mutati nelle nostre popolazioni per le diverse patologie. Questo nonostante un certo numero di allevatori continui a selezionare basandosi solo sul fenotipo, consideri solo lo stato clinico dei propri riproduttori e quindi sfugga a queste statistiche. Per applicare "breeding strategies" atte ad evitare l'eccessiva diffusione delle malattie ereditarie e al contempo il depauperamento del pool genetico è però necessaria l'applicazione dei test genetici.

Un punto di particolare interesse nel nostro studio è la scarsità di soggetti omozigoti (quindi potenzialmente malati) nelle forme autosomiche recessive ad insorgenza tardiva nel cane (PRA, MD, Cistinuria). Considerata l'alta percentuale di portatori di mutazione (25,5% PRA, 31,5% MD, 46,5% Cistinuria), ci si aspetterebbe un numero di omozigoti decisamente superiore. A tal proposito va segnalato che i cani cui ci riferiamo provengono

da allevamenti italiani riconosciuti i cui proprietari, anche senza un supporto medico veterinario, sono coscienti sia dei meccanismi di trasmissione genetica delle malattie sia dell'importanza dei test genetici. Tali cani sono di alta e nota genealogia e, già da tempo, sono certificati con test a DNA, e anche in base a questo selezionati per un allevamento di qualità anche sotto il profilo della salute. In questo contesto, la suddetta bassa frequenza degli omozigoti può non risultare comunque così grave se si considera che in diverse razze gli animali vengono sottoposti ai test genetici su base volontaria e la campionatura da noi esaminata è quindi soggetta a un effetto di *Bias*. Infatti, è possibile che alcuni allevatori effettuino sul cane in giovane età dei controlli non ufficiali (*pre-screening*) presso altri laboratori, spesso senza il prelievo di materiale biologico certificato da un medico veterinario. In seguito poi, su richiesta di un eventuale compratore, per ottenere un certificato ufficiale, invio a Vetogene solo i campioni risultati sani o portatori. A tale proposito ci preme ricordare che Vetogene e i laboratori *partner* (*Optigen* e *Antagene*) possiedono alcune licenze esclusive a livello mondiale per il rilascio di certificati dei test genetici brevettati.

Oggi in Italia, gli allevatori non sono obbligati a diffondere informazioni relative ai risultati dei test genetici e spesso, per mancanza d'informazione, non è possibile effettuare controlli sistematici degli allevamenti italiani e neppure disporre di studi di prevalenza su larga scala. Per questo motivo, a causa della notevole diffusione di alcuni disordini ereditari, come dimostrato nel presente articolo, sarebbe raccomandabile ed auspicabile che i singoli club di razza richiedessero, oltre alle già previste visite cliniche nel cane nell'ambito della Riproduzione Selezionata ENCI, anche i test genetici, per controllare tutte le forme a trasmissione ereditaria con manifestazione tardiva. I medici veterinari, a loro volta, dovrebbero impegnarsi a divulgare le informazioni relative alle malattie ereditarie sia agli allevatori che al pubblico, in modo da rendere i test genetici metodi di *screening* di comune impiego volti a ridurre i rischi legati a una riproduzione non controllata. Inoltre, è di fondamentale importanza che vengano promossi all'interno delle associazioni scientifiche, dei corsi formativi per veterinari e allevatori, mirati alla divulgazione dei dati di prevalenza delle malattie ereditarie sul territorio e dei metodi e delle strategie per l'applicazione sistematica dei test genetici e d'allevamento.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Paolo Valiati e Caterina Scilini, per l'attività di laboratorio relativa ai campioni utilizzati nel presente articolo.

Parole chiave

Cane, gatto, DNA, malattia ereditaria.

DNA Testing: new tools for diagnosis and prevention of inherited diseases in dogs and cats

Summary

Many genetic tests are nowadays available to identify the most common inherited diseases in dogs and cats. DNA based diagnostic procedures allow to clearly identify affected, clear and carrier ani-

mals for the mutations of interest. They allow the early identification of the healthy, affected and carrier animals even for 'late onset' (that develop years after birth) or with incomplete penetrance pathologies (when some individuals fail to express the trait, even though they carry the allele). In the following paper the transmission and prevention procedures for common inherited disorders with some results on prevalences, through the analysis of data collected by Vetogene spin off of the University of Milan in Italy, are presented.

Key words

Dog, cat, DNA, inherited disease.

BIBLIOGRAFIA

- Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nature Genetics* 39:1321-8, 2007.
- Available at: <http://www.offa.org/dnatesting/>. Accesso al sito 11 Marzo 2014.
- Ineke CM, Lavrijsen PA, Leegwater J et al. Genome Wide Analysis indicates genes for basement membrane and cartilage matrix proteins as candidates for Hip Dysplasia in Labrador Retrievers. *PLOS One* 9: 1-7 (e87735), 2014.
- Pertica G, Riva J, Strillacci MG, et al. Prevalence of inherited junctional epidermolysis bullosa in German shorthaired pointers bred in Italy *Veterinary Record* 167:751-752, 2010.
- Polli M, Bighignoli B, Strillacci MG et al. L'epidermolisi bollosa giunzionale ereditaria nel cane: diagnosi molecolare per l'identificazione dei portatori sani della malattia. *Veterinaria* 5:21-25, 2007.
- Brevetto N° MI2007A000036.
- Henthorn PS, Liu J, Gidalevich T et al. Canine cystinuria: polymorphism in the canine SLC3A1 gene and identification of a nonsense mutation in cystinuric Newfoundland dogs. *Human Genetics* 107:295-303, 2000.
- Beltran WA, Hammond P, Acland GM et al. A frameshift mutation in RPGR exon ORF15 causes photoreceptor degeneration and inner retina remodeling in a model of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47:1669-81, 2006.
- Ferreira P A. Insights into X-linked retinitis pigmentosa type 3, allied diseases and underlying pathomechanisms *Human Molecular Genetics* 14: 259-26, 2005.
- Genini S, Zangerl B, Slavik J et al. Transcriptional profile analysis of RPGRORF15 frameshift mutation identifies novel genes associated with retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 51: 6038-50, 2010.
- Meindl A, Dry K, Herrmann K et al. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3) *Nature Genetics* 13: 35-42, 1996.
- Vervoort R, Lennon A, Bird AC et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa *Nature Genetics* 25:462-466, 2000.
- Zhang Q, Acland GM, Wu WX et al. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human Molecular Genetics* 11: 993-1003, 2002.
- Parry HB Degenerations of the dog retina. II. Generalized progressive atrophy of hereditary origin. *British Journal of Ophthalmology* 37:487-502, 1953.
- Available at: http://www.vetogene.com/OPTIGEN/optigen_razze.htm. Accesso al sito 11 Marzo 2014.
- Available at: <https://www.optigen.com/>. Accesso al sito 11 Marzo 2014.
- Dekomien G., Runte M, Godde R et al. Generalized progressive retinal atrophy of Sloughi dogs is due to an 8-bp insertion in exon 21 of PDE6B gene. *Cytogenetic and Genome Research* 90:261-267, 2000.
- Kukekova AV, Goldstein O, Johnson JL et al. Canine RD3 mutation establishes rod-cone dysplasia type 2 (rzd2) as ortholog of human and murine rd3. *Mammalian Genome* 20: 109-123, 2009.
- Petersen-Jones SM, Entz DD, Sargan DR. cGMP Phosphodiesterase- α mutation causes progressive retinal atrophy in the Cardigan Welsh Corgi Dog. *Investigative ophthalmology & visual science*. 40: 1637-1644, 1999.
- Downs LM, Bell JS, Freeman J et al. Late onset progressive retinal atrophy in the Gordon Setter and Irish Setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71. *Animal Genetics* 44:169-177, 2013.
- Goldstein O, Kukekova AV, Aguirre GD et al. Exonic sine insertion in STK38L causes canine early retinal degeneration (erd) *Genomics* 96: 362-368, 2010.
- Zhang Q, Acland GM, Marshall CJ et al. Characterization of canine photoreceptor phosducin cDNA and identification of a sequence variant in dogs with photoreceptor dysplasia. *Gene* 215:231-239, 1998.
- Kijas JW, Zangerl B, Miller B et al. Cloning of the canine ABCA4 gene and evaluation in canine cone-rod dystrophies and progressive retinal atrophies. *Molecular Vision* 10:223-232, 2004.
- Kuznetsova T, Iwabe S, Battaglia KB et al. Exclusion of RPGRIP1 ins 44 from primary casual association with early onset cone-rod dystrophy in dogs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(9):5486-5501, 2012.
- Goldstein O, Mezey JG, Boyko AR et al. An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 established homology with human cone-rod dystrophy 9. *Molecular Vision* 16: 1549-1569, 2010.
- Zangerl B, Goldstein O, Alisdair RP et al. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 88: 551-563, 2006.
- Zhang Q, Acland GM, Johnson JL et al. Different RPGR exon ORF15 mutation in canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human molecular genetics* 11:993-1003, 2002.
- Kijas JW, Cideciyan AV, Aleman TS et al. Naturally occurring rhodopsin mutation in the dog causes retinal dysfunction and degeneration mimicking human dominant retinitis pigmentosa. *PNAS* 99(9):6328-6333, 2002.
- Wiik AC, Wade C, Biagi T et al. A deletion in nephronophthisis 4 (NPHP4) is associated with recessive cone-rod dystrophy in standard wire-haired dachshund. *Genome Research* 18: 1415-1421, 2008.
- Downs LM, Wallin-Hakansson B, Boursnell M et al. A Frameshit mutation in Golden Retriever Dogs with Progressive Retinal Atrophy Endorses SLC4A3 as a candidate gene for Human Retinal Degeneration. *Plos One* 6:1-9 (e21452), 2011.
- Available at: <http://research.vet.upenn.edu/Default.aspx?TabId=7620>. Accesso al sito 06 Marzo 2014.

32. Dekomien G, Vollrath C, Petrasch, Parwaz E et al. Progressive retinal atrophy in Schapendoes dogs: mutation of the newly identified CCDC66 gene. *Neurogenetics* 11:163-174, 2010.
33. Available at: <http://cvm.msu.edu/hospital/services/ophthalmology/papillon-pra-research>. Accesso al sito 06 Marzo 2014.
34. Goldstein O, Jordan JA, Aguirre GD et al. A non-stop S-antigen gene mutation is associated with late onset hereditary retinal degeneration in dogs. *Molecular Vision* 19:1871-1884, 2013.
35. Awano T, Johnson GS, Wade CM et al. Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2794-2799, 2009.
36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/403559>. Accesso al sito 9 Marzo 2014.
37. Coates JR, Wininger FA. Canine Degenerative Myelopathy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40(5):929-950, 2010.
38. Barnett KC Collie eye anomaly (CEA); *Journal Small Animal Practice* 20:537-542, 1979.
39. Rampazzo A, D'Angelo A, Capucchio MT et al. Collie eye anomaly in mixed-breed dog 8:357-360, 2005.
40. Mizumaki K, Chang HS, Ota M, et al. Collie Eye anomaly in Hokkaido dogs: case Study. *Veterinary Ophthalmology* 15: 128-132, 2012.
41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/610570>. Accesso al sito 01 Marzo 2014.
42. Lyons LA, Biller DS, Erdman CA et al. Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol* 15(10):2548-2555, 2004.
43. Grahn RA, Biller DS, Young AE et al. Genetic testing for feline polycystic kidney disease. *Animal Genetics* 35:462-504, 2004.
44. Bonazzi M, Volta A, Gnudi G et al. Comparison between ultrasound and genetic testing for the early diagnosis of polycystic kidney disease in Persian and Exotic Shorthair cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11: 430-434, 2009.
45. Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation* 99(24):3172-3180, 1999.
46. Meurs KM, Sanchez X, David RM et al. A cardiac myosin binding protein C mutation in the Maine Coon cat with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 14(23):3587-3593, 2005.
47. Meurs KM, Norgard MM, Ederer MM et al. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics* 90(2):261-264, 2007.
48. Nyberg MT, Koch J, Christiansen M. Intra-allelic Genetic Heterogeneity of Hypertrophic Cardiomyopathy in the Maine Coon Cat. *Hugo Human Genome Meeting HGM 2007*, Montreal, Canada Mon 21-Thu 24 May 2007. *Animal Models Poster Abstracts* n° 199.
49. Wess G, Schinner C, Weber K, Küchenhoff H, Hartmann K. Association of A31P and A74T polymorphisms in the myosin binding protein C3 gene and hypertrophic cardiomyopathy in Maine Coon and other breed cats. *J Vet Intern Med*. May-Jun; 24(3):527-32, 2010.
50. Longeri M, Ferrari P, Knafelz P et al. Myosin-binding protein C DNA variants in domestic cats (A31P, A74T, R820W) and their association with Hypertrophic Cardiomyopathy *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27:275-85, 2013.
51. Longeri M, Pertica G, Ferrari P, et al. The "Osservatorio italiano HCM felina": a feline inherited diseases network in Italy. *Proceedings of the 31th International Conference on Animal Genetics* Eds. International Society of Animal Genetics (ISAG) Jul. 20-24, 2008 Amsterdam (NL) (poster n. 5035).