

# LA MALATTIA DI VON WILLEBRAND NEL CANE. I. RECENTI ACQUISIZIONI DIAGNOSTICHE

## THE VON WILLEBRAND DISEASE IN THE DOG. I. REVIEW OF RECENT DIAGNOSTIC PROCEDURES

**GEORGE LUBAS<sup>1</sup>, ALESSANDRA GAVAZZA<sup>2</sup>, MARCO CALDIN<sup>3</sup>,  
TOMMASO FURLANELLO<sup>4</sup>, CECILIA TAMBONE<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Professore Associato di Clinica Medica Veterinaria, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa,  
Diplomato European College Veterinary Internal Medicine, Companion Animals - Internal Medicine

<sup>2</sup>Medico Veterinario, Dottore di Ricerca Patologia Ambientale Veterinaria, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa

<sup>3</sup>Medico Veterinario, Direttore Clinica Veterinaria Privata "San Marco", Padova

<sup>4</sup>Medico Veterinario, Direttore Laboratorio Veterinario "San Marco", Padova

<sup>5</sup>Biologo, Agrolabo spa, Romano Canavese, Torino

### Riassunto

In questa prima nota sono riportate le più recenti acquisizioni sulla malattia di von Willebrand (vWD), di origine ereditaria, determinata dalla carenza dell'omonimo Fattore di von Willebrand (FvW), che induce essenzialmente un disturbo della fase primaria o vasculo-piastrinica dell'emostasi. La frequenza del gene mutato, responsabile di questa patologia, è piuttosto elevata in diverse razze di cani ed anche nei meticci. La complessità genica del FvW comporta la manifestazione di ben tre tipi diversi di vWD. La vWD di tipo 1 risulta essere molto frequente nella razza Dobermann Pinscher, dove, in questi ultimi anni, è stata chiarita l'ereditarietà, che è di tipo autosomico recessivo. Gli altri due tipi di vWD determinano una grave patologia dell'emostasi ma sono limitate a particolari razze canine. La diagnosi della vWD, si effettua dopo aver eseguito un profilo emostatico, che evidenzia un deficit della fase vasculo-piastrinica per mezzo del tempo di sanguinamento alla mucosa buccale e di un test che valuta la quantità di FvW. Per alcune razze (Doberman, Manchester Terrier, Barbone, Pembroke Welsh Corgi, Pastore Shetland e Kooiker olandese) è disponibile un test con tecnologia DNA che è in grado di determinare con buona certezza soggetti sani, portatori e malati. La diagnosi sul tipo di vWD si effettua con una analisi elettroforetica multimerica.

### Summary

This first note describes the most recent findings on the von Willebrand disease (vWD), an inherited disorder, caused by the von Willebrand Factor deficiency (vWF), which induces essentially an impairment of primary or vascular-platelet phase of hemostasis. The frequency of the mutated gene causing this disease is rather high in several breeds of dogs and mongrels too. The gene complexity produces as many as three different types of the disease. The vWD type 1 is very common in the Dobermann Pinscher breed, where, in recent years, the inheritance (autosomic recessive type) has been identified. The other two types of vWD induce a severe hemostatic disorder involving some particular dog breeds. Generally, the vWD diagnosis is carried out after an hemostatic profile which points out a vascular-platelet phase deficiency by means of a buccal mucosal bleeding time and by means of an assay, which evaluates the vWF amount. In some breeds (Doberman, Manchester Terrier, Poodle, Pembroke Welsh Corgi, Shetland sheepdog, and Dutch Kooiker) an assay with DNA technology is available, which is able to determine with good precision healthy, carrier, and affected animals. The vWD type diagnosis is performed with an electrophoretic multimeric analysis.

## DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

La malattia di von Willebrand (vWD = von Willebrand Disease) è la patologia ereditaria dell'emostasi di frequente riscontro nel cane ed è stata segnalata in oltre 54 razze diverse, con una elevata prevalenza in quella Dobermann (Tab. 1). Questa malattia è caratterizzata dalla diminuzione o dalla mancanza dell'omonimo fattore della coagulazione (FvW= Fattore di von Willebrand), che ricopre un ruolo determinante sia nell'emostasi primaria che in quella secondaria<sup>1-9</sup>.

## EZIOPATOGENESI

Il FvW è una glicoproteina multimerica ad attività adesiva composta da subunità polipeptidiche di 270 kDa (kiloDalton) legate tra loro da ponti disolfuro, in modo da formare

## TERMINOLOGY AND EPIDEMIOLOGY

The von Willebrand disease (vWD) is an inherited disorder of hemostasis widely found in dogs. vWD has been reported in more over than 54 different breeds, with a particular high prevalence in the Dobermann (table 1). A reduction or absence of the von Willebrand Factor (vWF), which covers a fundamental role in both primary and secondary hemostasis, characterizes this disease<sup>1-9</sup>.

## ETIOPATHOGENESIS

The vWF is a multimeric glycoprotein with adhesive activity, composed by polypeptidic subunits of 270

**Tabella 1**  
Prevalenza (espressa in percento) della Malattia di von Willebrand (vWD) in varie razze canine<sup>5, 6</sup>

<i>Razze con elevata prevalenza del gene vWD (15-80%)</i>		
Dobermann*	Airdale terrier	Barbone, Barbone nano
Basset Hound	Bassotto, Bassotto nano	Golden Retriever
Keeshound	Manchester Terrier	Manchester Toy Terrier
Pastore Shetland	Pastore Tedesco	Pembroke Welsk Corgi
Rottweiler	Schnauzer nano	Scottish Terrier
<i>Razze con ridotta od incerta prevalenza del gene vWD</i>		
Akita inu	Alaskan Malamute	Alano
Bearded Collie	Bichon Frisé	Bovaro Bernese
Boxer	Cairn Terrier	Chesapeake Bay Retriever
Cocker Spaniel Americano	Cocker Spaniel Inglese	Dutch kooiker
Fox Terrier	Kerry Blue Terrier	Kuvazs
Irish Wolfhound	Lakeland Terrier	Levrier afgano
Levrier italiano	Lhasa Apso	Papillon
Pastore Pirenei	Pointer Tedesco (sh & wh)	Rough collie
Samoyedo	Schnauzer gigante	Setter Inglese
Setter Irlandese	Shih Tzu	Siberian Husky
Tibetan Terrier	Vizsla	Wheaton Terrier
Whippet	Yorkshire Terrier	

\* = termine impiegato per il Dobermann Pinscher in questo lavoro; l'elenco è compilato per ordine alfabetico.

**Table 1**  
Prevalence (expressed as percentage) of von Willebrand disease (vWD) in several dog breeds<sup>5, 6</sup>

<i>Breeds with high prevalence of vWD gene (15-80%)</i>		
Dobermann*	Airdale terrier	Basset Hound
Duchshund toy & standard	Manchester Terrier toy & standard	German Shepherd
Golden Retriever	Keeshound	Pembroke Welsk Corgi
Poodle toy & standard	Rottweiler	Scottish Terrier
Schnauzer miniature	Shetland Sheepdog	
<i>Breeds with low or uncertain prevalence of vWD gene</i>		
Afghan hound	Akita inu	Alaskan Malamute
American Cocker Spaniel	Bearded Collie	Bernese mountain dog
Bichon Frisé	Boxer	Cairn terrier
Chesapeake Bay Retriever	Dutch kooiker	English Cocker Spaniel
English Setter	English springer spaniel	Fox Terrier
German Pointer (sh & wh)	Great Dane	Great Pyrenees
Greyhound	Irish Setter	Irish Wolfhound
Italian Greyhound	Kerry Blue Terrier	Kuvazs
Labrador retriever	Lakeland Terrier	Lhasa Apso
Papillon	Rough collie	Samoyedo
Shih Tzu	Siberian Husky	Schnauzer (giant)
Tibetan Terrier	Vizsla	Wheaton Terrier sc
Whippet	Yorkshire Terrier	

\* = statement used for Dobermann Pinscher in this report; the list is reported in alphabetic order

sia elementi a basso che ad elevato peso molecolare (multimeri da 0,5 fino a 20 milioni di Da). Il FvW è sintetizzato ed assemblato primariamente nelle cellule endoteliali e secondariamente nei megacariociti. A livello delle cellule endoteliali viene immagazzinato nei corpi di Weibel Palade e una quantità veramente minima si rinviene nei granuli alfa delle piastrine e dei megacariociti. In genere, i multimeri ad elevato peso molecolare, in deposito, hanno una più elevata attività emostatica, rispetto ai multimeri a basso peso molecolare (dimeri o polimeri) circolanti. La secrezione dalle riserve nelle cellule endoteliali è indotta da istamina, vasopressina, trombina, fibrina ed estrogeni, mentre la liberazione dalle riserve delle piastrine è stimolata da collagene, ADP, fattore attivante le piastrine (PAF), adrenalina e trombina<sup>5, 10</sup>.

Il FvW favorisce l'adesione delle piastrine al subendotelio o su altre superfici trombogeniche mediante un legame con la glicoproteina di superficie piastrinica Ib-IX (Gp Ib-IX). Inoltre, interviene nell'aggregazione piastrinica tramite l'interazione con i recettori di membrana piastrinica GpIIb/IIIa, chiamati integrine alfa IIb/beta 3, che hanno anche attività recettoriale verso il fibrinogeno e la fibronectina. I multimeri ad alto peso molecolare, avendo un maggior numero di siti di legame con cui poter interagire con le piastrine, sono emostaticamente più attivi. Infine, il FvW è l'indispensabile trasportatore della molecola FVIII, poiché sembra proteggerla dalla proteolisi, prolungandone così l'emivita in circolo<sup>5</sup>.

## TIPI DI MALATTIA DI VON WILLEBRAND

La vWD è determinata da mutazioni ereditarie del gene vWF che si esprimono fenotipicamente nel cane in tre tipi principali (Tab. 2).

Nella vWD di tipo 1 (in precedenza erano usati i numeri romani), la forma più frequente nella maggior parte delle razze, vi è una anomalia di tipo quantitativo, cioè una carenza generalizzata, in alcuni casi minima, dei diversi multimeri del FvW<sup>3, 11</sup>. Per molto tempo, si è ritenuto che fosse trasmessa in modo autosomico dominante a penetranza incompleta<sup>1, 8, 12</sup>. Dopo la caratterizzazione genetica, è stata stabilita la trasmissione come autosomica recessiva, ma solo per le razze Dobermann, Manchester terrier, Barboncino e Pembroke Welsh Corgi<sup>13-16</sup>. Per le altre razze canine, rimane al momento valida l'ipotesi che si tratti di un gene autosomico dominante a penetranza incompleta e tra l'altro viene ancora riproposta questa stessa modalità in alcuni recenti lavori anche nel Dobermann<sup>17, 18</sup>.

La forma di vWD di tipo 2 è caratterizzata da un difetto di tipo qualitativo, in quanto mancano solo i multimeri a più alto peso molecolare, emostaticamente più attivi. Per l'identificazione certa di questo tipo di difetto occorre un'analisi multimerica. Il difetto genetico è trasmesso in forma autosomica recessiva nel Pointer Tedesco a pelo corto e a pelo ruvido<sup>19, 20</sup>.

Infine la vWD di tipo 3, la più grave, ma anche la più rara, è trasmessa in modo autosomico recessivo, ed è caratterizzata dalla mancanza assoluta e generalizzata del FvW. È stata segnalata come problema familiare nel Pastore delle Shetland, Scottish Terrier, Chesapeake Bay retriever e Dutch Kooiker<sup>21-26</sup>. Inoltre, come segnalazione sporadica viene riportata nel Border collie, Bull terrier, Cocker spaniel, Labrador retriever, Volpino di Pomerania e nei meticci<sup>3</sup>.

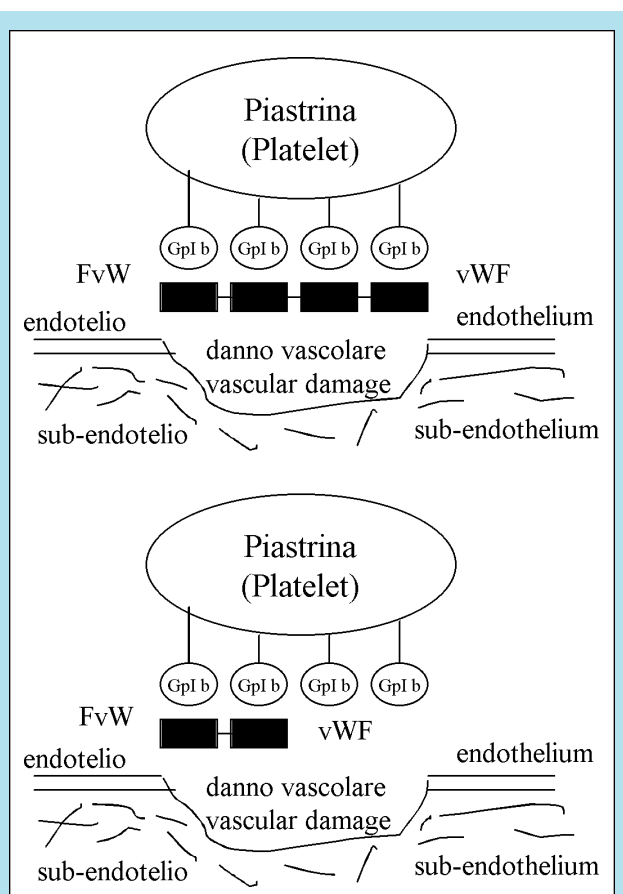


FIGURA 1 - Sul danno vascolare avviene l'adesione delle piastrine al subendotelio. Il legame delle piastrine si verifica tramite i recettori piastrinici della glicoproteina Ib, mediati dal fattore di von Willebrand. Poiché i multimeri di von Willebrand a peso molecolare maggiore hanno un elevato numero di siti di legame sono più efficaci nell'adesione rispetto ai multimeri a basso peso molecolare.

FIGURE 1 - On the vascular damage occurs the platelet adherence to the subendothelium. The binding of platelets engages platelet glycoprotein Ib receptors and is mediated by von Willebrand factor. Because they have more binding sites than do smaller multimers, large von Willebrand factor multimers are more effective in adhering to the subendothelium.

kDa (kiloDalton) linked all together by disulfure bonds, in such a way to constitute both low and high molecular weight elements (multimers from 0.5 to 20 millions of DA). The vWF is synthesized and assembled primarily in endothelial cells and secondarily in megakaryocytes. In endothelial cells, vWF is stored in the Weibel Palade bodies and very low amounts of vWF are present in alpha granules of both platelets and megakaryocytes. Generally, stored high molecular weight multimers have a higher hemostatic activity in comparison to circulating low molecular weight multimers (dimers or polymers). The secretion from endothelial cells stores is induced by histamine, vasopressin, thrombin, fibrin, and oestrogens, whereas the releasing from the platelets storages is stimulated by collagen, ADP, platelet activating factor (PAF), adrenaline, and thrombin<sup>5, 10</sup>.

The vWF allows the platelet adhesion to the subendothelium or upon other thrombogenic surfaces by

**Tabella 2**  
Caratteristiche dei diversi tipi di vWD<sup>5</sup>

tipo vWD	eredità	segni clinici	multimeri FvW elevato PM	multimeri FvW basso PM	FVIII:C	frequenza *	razze più colpite
tipo 1	autosomica dominante incompleta	moderati			N /		Golden Retriever, Schnauzer
tipo 1	autosomica recessiva	moderati			N /		Dobermann, Manchester Terrier**
tipo 2	autosomica recessiva	gravi		non rilevabili	ignoto		Pointer Tedesco
tipo 3	autosomica recessiva	gravi	non rilevabili	non rilevabili		moderata	Scottish Terrier

FVIII:C = fattore VIII ad attività procoagulante; PM = peso molecolare; N= normale; = alto = basso; = molto basso; \* = si intende nelle razze più colpite; \*\* = ed anche Barbone e Pembroke Welsh Corgi

**Table 2**  
Features of the several vWD types<sup>5</sup>

vWD type	inheritance	clinical signs	vWF multimers high MW	vWF multimers low MW	FVIII:C	frequency **	commonly breeds affected
type 1	autosomal incomplete dominant	moderate			N /		Golden Retriever, Schnauzer
type 1	autosomal recessive	moderate			N /		Dobermann, Manchester Terrier*
type 2	autosomal recessive	severe		not detectable	unknown		German Pointer
type 3	autosomal recessive	severe	not detectable	not detectable		moderate	Scottish Terrier

FVIII:C = factor VIII with pro-coagulant activity; MW = molecular weight; N= normal; = high; = low; = very low; \* = in the most commonly affected breeds; \*\* = also Poodle and Pembroke Welsh Corgi

A tutt'oggi, non è stata dimostrata nel cane una forma acquisita di vWD, sebbene sia sospettata. In seguito ad un lavoro di correlazione tra i dosaggi di FvW e di ormone tiroideo, fu sospettata una relazione tra vWD ed ipotiroidismo<sup>27</sup>. Ulteriori indagini hanno permesso di stabilire che non esiste un collegamento diretto tra le due patologie, ma che la vWD e l'ipotiroidismo si manifestano come eventi genetici predisponenti nell'ambito delle medesime razze canine<sup>4</sup>.

La sintomatologia della vWD è estremamente variabile ed è legata ai meccanismi ereditari ed al fatto che il FvW è coinvolto essenzialmente nell'emostasi primaria e parzialmente in quella secondaria. Inoltre, la quantità di FvW presenta delle fluttuazioni fisiologiche (stress, esercizio fisico, gravidanza, calore) e patologiche (disendocrinie, neoplasie, processi flogistici etc.), come anche delle oscillazioni derivanti dalla tecnica di prelievo ematico e dalla preparazione del campione per la sua determinazione quantitativa<sup>28, 29</sup>.

Nel cane Dobermann, che manifesta in assoluto la maggiore prevalenza della vWD, grazie agli studi sul DNA, i soggetti omozigoti per il gene mutante vWD (di tipo 1) risultano essere a serio rischio di manifestare sintomi clinici, specialmente a seguito di traumatismi o durante interventi chirurgici banali, come ad es. la caudectomia o la conchectomia, mentre questa evenienza è difficile negli eterozigoti. Nelle razze che presentano la vWD di tipo 2 e 3, i soggetti omozigoti manifestano sempre forme gravi di patologie

means of a connection with a platelet surface glycoprotein Ib-IX (Gp Ib-IX). Moreover, vWF mediates the platelet aggregation by means of an interaction with the platelet membrane receptors GpIIb/IIIa, called alpha IIb/beta 3 integrins, which have also receptorial activity toward both fibrinogen and fibronectin. The high molecular weight multimers, having a higher number of binding sites, which can interact with platelets, are more active in hemostasis. Finally, vWF is the essential carrier of FVIII molecule, because it seems to protect FVIII from proteolysis, increasing its half-life in the circulation<sup>5</sup>.

## VON WILLEBRAND DISEASE TYPES

The vWD is caused by genetic mutations in the vWF gene. In the dog the genetic mutations are phenotypically exhibited in three main types (table 2).

In the vWD type 1 (previously, cardinal numbers were used), the more common form in most of dog's breeds, there is a quantitative type anomaly, namely a generalized deficiency, in some cases minimal, of the several vWF multimers<sup>3, 11</sup>. For long time, this form has been thought to be inherited as dominant autosomal



dell'emostasi. La diatesi emorragica tipica della vWD interessa frequentemente le mucose con quadri di epistassi, gengivorragie, ematuria e melena; meno sovente si hanno emorragie cavitari come ad es. ematriti od ematomi cutanei. Talvolta, è stata segnalata la comparsa di una claudicazione a carico degli arti posteriori, dovuta alla presenza di tessuto eterotopico osseo nelle masse muscolari, come risultato di emorragie a carico dei vasi muscolari e periostali con successiva organizzazione del coagulo<sup>1-9, 12, 30</sup>.

## DIAGNOSI

La diagnosi della malattia di von Willebrand si poggia sugli esami di laboratorio ed infatti l'esecuzione di un profilo emostatico permette di inquadrare inizialmente il problema come un difetto della fase primaria della emocoagulazione<sup>1-9</sup>.

La lista degli esami per l'inquadramento diagnostico iniziale deve includere la conta piastrinica e quindi il tempo di sanguinamento della mucosa buccale o Tempo di Emorragia (BMBT = Buccal Mucosal Bleeding Time) che risulta generalmente allungato nella vWD. Il Tempo di Protrombina (PT) nella vWD è normale ed il Tempo di Tromboplastina Parziale attivato (aPTT) è normale o modicamente allungato. La conta delle Piastrine (Plt) ed il dosaggio dei Prodotti di Degradazione della Fibrina/Fibrinogeno (FDP) sono entrambi nella norma<sup>2, 5</sup>.

La diagnosi specifica della vWD si basa sulla determinazione quantitativa dell'antigene FvW (FvW:Ag), mediante una tecnica ELISA. Sul mercato ne esistono alcune varianti, sotto forma di kit commerciali<sup>31-34</sup>. Nella valutazione del risultato quantitativo ottenuto, occorre tenere conto dei diversi interferenti pre-analitici dovuti sia al paziente che al campione. Le altre tecniche, come ad esempio la immunoelettroforesi detta 'Laurell rocket' (EIA), o l'aggregazione piastrinica alla ristocetina o alla botrocetina sono state ormai abbandonate perché troppo laboriose od imprecise<sup>5</sup>. Di recente, è stato validato per la specie canina un sistema composto da uno strumento e da apposite cartucce contenenti collagene o ADP (PFA-100<sup>TM</sup>, Boehringer), nel quale il processo di adesione ed aggregazione piastrinica legato ad un danno vascolare viene simulato in vivo. Il sistema è risultato valido anche per uno screening di base, in corso di vWD, utilizzando solamente l'attivatore dell'aggregazione ADP<sup>35</sup>. Invece, l'analisi elettroforetica su gel di agarosio (analisi multimerica) serve a caratterizzare il tipo di vWD, identificando se la carenza coinvolge solo i multimeri ad alto PM o se invece sia generalizzata<sup>5, 10</sup>.

Infine, per alcune razze di cani (Dobermann, Manchester Terrier, Barbone, Pembroke Welsh Corgi, Pastore Shetland e Kooiker olandese) sono disponibili alcuni test con tecnologia DNA (mediante l'uso sia di marker intragenici che di marker localizzati vicino al gene vW), che permettono di identificare i soggetti malati. Queste analisi sono soprattutto utili nei soggetti eterozigoti che risultano difficili da riconoscere con la sola analisi quantitativa, anche se vi sono a disposizione altre indagini cliniche e laboratoristiche<sup>3, 14, 36, 37</sup>. Questi test sono utilissimi per la scelta dei riproduttori, al fine di identificare correttamente i soggetti eterozigoti che possono avere ancora una quantità di FvW compatibile con una funzionalità emostatica accettabile, che non provoca sintomi clinici, se non concorrono altre patologie emostatiche ad aggravare il quadro.

mode with incomplete penetrance<sup>1, 8, 12</sup>. After the genetic characterization, the inheritance as recessive autosomal has been established, including Dobermann, Manchester terrier, Poodle, and Pembroke Welsh Corgi breed only<sup>13-16</sup>. For the other dog breeds, the hypothesis as a dominant autosomal gene with incomplete penetrance remains at the moment as accepted explanation. This hypothesis has been still proposed in recent papers regarding the Dobermann breed<sup>17, 18</sup>.

The vWD type 2 is characterized by a qualitative defect, because the high molecular weight multimers, more active hemostatically, are missing. The certain identification of this type of defect needs a multimeric analysis. The genetic defect is inherited as recessive autosomal mode in the German Pointer, both short-haired and wire-haired<sup>19, 20</sup>.

Finally the vWD type 3, the most severe, but also the most rare condition, is inherited as autosomal recessive, and it is characterized by absolute and generalized vWF lacking. This type has been reported as a familial problem in the Shetland sheepdog, Scottish Terrier, Chesapeake Bay retriever, and Dutch Kooiker<sup>21-26</sup>. Moreover, as a sporadic report is described in the Border collie, Bull terrier, Cocker spaniel, Labrador retriever, Pomeranian, and mixed breed<sup>3</sup>.

Up today, an acquired form of vWD has not been demonstrated in dogs. However, it has been suspected. After a paper, considering vWF and thyroid hormone dosages, a relationship was suspected between vWD and hypothyroidism<sup>27</sup>. Further investigations established that no direct relationship between these two disorders exists, but both vWD and hypothyroidism are occurring in the same dog breeds as predisposing genetic event<sup>4</sup>.

The vWD clinical findings are extremely variable and they are linked mainly to the hereditary mechanism and due to the fact that vWF is involved essentially in primary hemostasis, and partially in secondary hemostasis as well. Moreover, vWF amount shows physiological (stress, physical exercise, pregnancy, heat) and pathological (endocrine disturbances, tumours, inflammatory diseases, etc.) fluctuations. Variation could be also derive from the blood collection technique and sample preparation for the assay measuring<sup>28, 29</sup>.

In the Dobermann dog, which has absolutely the highest prevalence of the disease, thanks to the DNA studies, the homozygote subjects for the type 1 vWD mutant gene, are at serious risk to show the clinical symptoms. The homozygotes are at risk, particularly after a trauma or during standard surgery procedures such as i.e. tail or ear cutting. This occurrence is rare in the heterozygote animals. In the breeds having the vWD type 2 or type 3, the homozygote subjects always show severe forms of hemostasis disorders. The typical vWD hemorrhagic disturbance involves commonly the mucosal surfaces with epistaxis, gingival bleeding, hematuria, and melena. Less frequently, animals have hemorrhage in cavities such as hemarthrosis and cutaneous hematomas. Occasionally, the oc-

Gli estensivi studi sulla genetica molecolare della vWD hanno permesso di chiarire la natura della mutazione responsabile della patologia nel cane di razza Dobermann. Si tratta di una mutazione sul sito di giunzione, e la giunzione alternativa mutata si manifesta in circa il 90-95% dei casi. Questo spiega perché l'eredità della vWD nel Dobermann per lungo tempo è stata oggetto di dibattito e fornisce l'evidenza che questa razza presenta una forma più lieve di malattia rispetto ad es. allo Scottish Terrier<sup>14</sup>.

Il cane Dobermann malato ha due copie del gene mutato. Ciascuna copia è capace di produrre ancora il 5-10% del FvW. Ciò avviene, perché talora è impiegata una parte del gene senza la mutazione giunzionale, che consente questa attività residua di FvW. Invece, se viene usata la copia con incluso il sito di giunzione mutato non si produce affatto FvW e ciò si verifica nel 90-95% dei casi. Dal momento che, complessivamente ciascun gene mutato, può produrre comunque un 5-10% di FvW, il Dobermann affetto ne ha dose doppia, cioè ha il 10-20% di FvW nel sangue. Gli animali malati con questa ridotta e residua attività di FvW, saggati per il FvW:Ag con vari test analitici, risultavano avere valori, intorno al 10-20%, senza però avere nessuna anamnesi di sanguinamento. Infatti, se questi soggetti erano sottoposti a chirurgia, e la quantità di perdita ematica non era troppo elevata, non era registrato alcun sanguinamento incontrollato. Ciò non significa che la vWD nel Dobermann non sia pericolosa. Infatti, la letteratura è ricca di segnalazioni di gravi sanguinamenti imprevedibili nella razza Dobermann, talora responsabili anche di morte. Vi sono una serie di fattori, noti ed ignoti, che influenzano il decorso clinico in un determinato paziente. Per primo i fattori della coagulazione, tra cui il FvW che sono consumati durante l'emostasi. Infatti, più elevato è il sanguinamento da una ferita accidentale o chirurgica, più risulta alto il loro consumo. Quindi, è possibile che la limitata disponibilità di FvW in un Dobermann affetto sia completamente utilizzata, inducendo un nuovo sanguinamento, stavolta provocato dalla deficienza di FvW. Inoltre, c'è anche una variazione consistente della quantità di FvW nei Dobermann affetti. Un cane con un valore del 5% di FvW:Ag è a rischio più elevato di quello con il 15%. Pertanto, altre componenti, come ad es. fattori tissutali o della coagulazione che non vengono misurati e variano da un soggetto all'altro, inducono una differenza nel rischio di sanguinamento in una particolare situazione e la vWD deve essere tenuta in considerazione come un rischio significativo<sup>14, 18</sup>.

La frequenza del gene della vWD nel Dobermann allevato negli USA è riportato essere oltre il 60%, ma ciò non fornisce una misura corretta del problema. Da questa stima, assumendo allora una frequenza genica di 0,6 (cioè il 60% dei geni sono mutanti), ed impiegando la legge di Hardy-Weinberg, è possibile calcolare la frequenza dei diversi fenotipi nei Dobermann. Quindi, circa il 36% sono omozigoti ed affetti (doppia dose del gene mutato, con rischio di sanguinamento da lieve a moderato), il 48% sono portatori (un gene normale ed uno mutante, senza effettivo rischio di sanguinamento) ed un 16% sono omozigoti sani (doppia dose di gene normale). Dai risultati sullo studio con tecnologia DNA condotto su 3.207 Dobermann i valori furono i seguenti: esenti 28,1%, portatori 48,9%, affetti 23,0%, così la frequenza genica del gene vWD era di 0,474<sup>36</sup>.

I portatori del gene mutante non sono a rischio di sanguinamento per la vWD, ma ovviamente trasmettono il gene

currence of gait abnormality localized to rear limbs has been reported, due to the presence of bone heterotopic tissue in the muscular mass, as the result of hemorrhage involving muscular and periosteal vessels with subsequent organization of the blood clot<sup>9, 12, 30</sup>.

## DIAGNOSIS

The diagnosis of vWD is based on the laboratory exams. Indeed, the hemostatic profile allows to classify initially the problem as a defect of the primary phase of hemocoagulation<sup>1, 9</sup>.

The list of exams for the initial diagnostic classification should include the platelet count and then the buccal mucosal bleeding time (BMBT) which results generally prolonged in vWD. The Prothrombin time (PT) is normal in vWD, and the activated Partial Thromboplastin Time is either normal or slightly prolonged in vWD. The platelet (Plt) count and the Fibrin/ogen Degradation Products (FDP) are both normal in vWD<sup>2, 5</sup>.

The specific diagnosis of vWD is based on the amount detection of vWF antigen (vWF:Ag) by means of an ELISA technique. Some variants of this test are present in the market as commercial kits<sup>31-34</sup>. In the evaluation of the quantitative result obtained, several pre-analytical interferants should be considered, due either to the patient or sample. The other techniques, such as i.e. the immune electrophoresis called 'Laurell rocket' (EIA), or the platelet aggregation using both ristocetin or botrocetin, have been left over because too laborious or inaccurate<sup>5</sup>. Recently, a system including an instrumentation and special cartridge containing collagen or ADP has been validated in the canine species (PFA-100<sup>TM</sup>, Boehringer). In this device, the adhesion process and the platelet aggregation linked to a vascular damage, is simulated in-vivo. A study demonstrated that this device is valid for a basic screening for vWD, utilizing only the ADP as aggregating agent<sup>35</sup>. On the contrary, the electrophoretic analysis on agarose gel (multimeric analysis) helps to characterize the type of vWD, identifying if the deficiency is occurring in the high MW multimers only or otherwise is occurring as a generalized form<sup>5, 10</sup>.

Finally, for some dog breeds (Dobermann, Manchester Terrier, Poodle, Pembroke Welsh Corgi, and Shetland sheepdog) few DNA technology assays (using markers both intragenic or located nearby vW gene), are available that allow the identification of affected animals. These assays are particular useful in heterozygote subjects, which are difficult to assess with the quantitative analysis only, even if they have clinical and laboratory findings that could be useful for their classification<sup>3, 14, 36, 37</sup>. Moreover, these assays are very useful for the reproduction selection, in order to identify correctly the heterozygote subjects. Indeed, these animals could have yet a vWF amount compatible with an acceptable hemostatic function, in such a way the clinical

mutante alla loro progenie con una probabilità del 50% dei casi. Approssimativamente, sono stati stabiliti i limiti dei livelli del FvW:Ag, cioè sono di 5-20% per i malati, 30-100% per i portatori (eterozigoti) e 50-130% per gli esenti omozigoti. Bisogna annotare l'elevata sovrapposizione tra i livelli dei portatori e di quelli dei sani. Ciò, rende conto dell'incapacità dell'analisi sul dosaggio del FvW:Ag nell'identificare il Dobermann portatore del vWD. Rimane però ancora valida la classificazione dei cani sicuramente affetti quando hanno un valore di FvW:Ag al di sotto del 20%<sup>14, 18</sup>.

Pertanto la diagnosi di vWD nel cane si basa sui test ELISA, a cui devono essere affiancati i dati del quadro clinico globale, degli eventuali fattori di interferenza e degli altri esami emocoagulativi. Per la diagnosi genetica, invece sono molto utili ed appropriate le informazioni derivanti dai risultati della tecnologia con DNA, ma solo per le razze in cui questi test sono disponibili.

## Bibliografia

1. Brooks M: Management of Canine von Willebrand's Disease. *Probl Vet Med*, 4: 636-646, 1992.
2. Brooks M: Hereditary Bleeding Disorders in Dogs and Cats. *Vet Med*, 6: 555-564, 1999.
3. Brooks M: von Willebrand Disease. In: Schalm's Veterinary Hematology, Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC ed, 5th edit, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp 509-515.
4. Carr AP, Panciera DL: von Willebrand's Disease and Other Hereditary Coagulopathies, In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Ed by Bonagura, Philadelphia, WB Saunders & Co, 2000, pp 434-437.
5. De Goegeui RR, Feldman BF: von Willebrand's Disease. *Comp Haem Intl*, 7: 187-196, 1997
6. Dodds WJ, Raymond SL, Brooks M: Inherited and Acquired von Willebrand's Disease, Part 1. *Vet Pract Staff*, 5: 13-17, 1993
7. Meyers KM, Wardrop KJ, Meinkoth J: Canine von Willebrand's Disease: Pathobiology, Diagnosis, and Short-term Treatment. *Comp Cont Educ Vet Pract*, 14: 13-22, 1992
8. Stokol T, Parry BW: Canine von Willebrand's disease: a Review. *Aust Vet Pract*, 23: 94-103, 1993
9. Thomas JS: von Willebrand's Disease in the Dog and Cat. *Vet Clin North Amer, Small Anim Pract*, 26: 1089-1110, 1996.
10. McCarroll DR, Waters DC, Steidley KR, et al.: Canine platelet von Willebrand factor: quantification and multimeric analysis. *Exp Hematol*, 16 (11): 929-937, 1988.
11. Sadler JE, Gralnik HR: Commentary: A New Classification for von Willebrand Disease. *Blood*, 84: 676-679, 1994
12. Littlewood JD, Herrtage ME, Gorman NT, et al.: von Willebrand's Disease in the United Kingdom. *Vet Rec*, 121: 463-468, 1987.
13. Brewer GJ: DNA Studies in Dobermann von Willebrand's Disease. [WWW.vetgen.com](http://WWW.vetgen.com), 1-4, 2000.
14. Brewer GJ, Venta PJ, Schall W, et al.: DNA tests for von Willebrand's disease in Dobermanns, Scotties, Shelties, and Manchester terriers. *Canine Pract* 23: 45, 1998.
15. Moser J, Meyers KM, Russon RH: Inheritance of von Willebrand's Factor Deficiency in Dobermann Pinchers. *J Am Vet Med Assoc*, 209: 1103-1106, 1996.
16. Johnson GS, Turrentine MA, Kraus KH: Canine von Willebrand's Disease. A Heterogeneous Group of Bleeding Disorders. *Vet Clin North Amer, Small Anim Pract*, 18: 195-229, 1988.
17. Riehl J, Okura M, Mignot E, et al.: Inheritance of von Willebrand's Disease in a Colony of Dobermann Pinschers. *Am J Vet Res*, 61: 115-120, 2000.
18. Brooks M, Hollis NE, Foureman PA, et al.: von Willebrand disease phenotype and von Willebrand factor marker genotype in Dobermann Pinschers. *Am J Vet Res*, 62: 364-369, 2001.
19. Brooks M, Raymond S, Catalfamo J: Severe Recessive von Willebrand's Disease in German Wirehaired Pointers. *J Am Vet Med Assoc*, 209: 926-929, 1996.
20. Brooks M, Raymond S, Catalfamo J: Plasma von Willebrand's Factor Antigen Concentration as a Predictor of von Willebrand's Disease Status in German Wirehaired Pointers. *J Am Vet Med Assoc*, 209: 930-933, 1996.
21. Brooks M, Dodds WJ, Raymond SL - Epidemiologic Features of von Willebrand's Disease in Dobermann Pinchers, Scottish Terriers, and Shetland Sheepdogs: 260 cases (1984-1988) - *J Am Vet Med Assoc*, 200: 1123-1127, 1992.
22. Rieger M, Schwarz HP, Turecek PL, et al.: Identification of Mutations in

signs do not appear, unless concurrent other coagulation disorders intervene.

The extensive studies on the molecular genetic of vWD have allowed new findings about the nature of the mutation involved in the disease of Dobermann dog breed. A mutation on the junction site is occurring, and the alternative mutated junction is appearing in about 90-95% of cases. This phenomena explains why the vWD inheritance in the Dobermann for long time has been an object of discussion, and it supplies evidence that this breed displays a less severe form of disease in comparison i.e. to the Scottish Terrier<sup>14</sup>.

The affected Dobermann dog has two copies of mutated gene. Each gene is able to produce yet 5-10% of vWF. This happens because occasionally, only a part of the gene without the junctional mutation is used, that allows this residual vWF activity. On the contrary, if the copy with the mutated junctional site included is used, vWF is not produced at all, and this is occurring in 90-95% of cases. Since each mutated gene as a whole may produce however a 5-10% of vWF, the Dobermann affected has two copies, namely it has 10-20% of vWF in the blood. The affected animals with this low residual activity of vWF, assayed for vWF:Ag with several analytical tests resulted to have low values of vWF:Ag, about 10-20%, without any history of bleeding. Indeed, if these affected animals have been experienced surgery, and the amount of blood loss was not elevated, an uncontrolled bleeding was not recorded. This does not mean that the vWD in the Dobermann is not dangerous. Indeed, the literature includes numerous reports of severe unexpected bleeding in the Dobermann breed, sometimes leading to the animal's death. There are a few of factors, some unknown that influences the clinical course in a patient. Formerly, the coagulation factors, including vWF, which is utilized during hemostasis was considered. Indeed, the more copious is the bleeding from an occasional or surgical injury, the more elevated is the consumption of coagulation factors.

Therefore, it is possible that the limited availability of vWF in a Dobermann affected will be completely utilized, inciting a new bleeding, this time induced by the vWF deficiency. A dog with a value of 5% of vWF:Ag has more risk than a dog with 15% of vWF:Ag. Therefore, other components, such as i.e. tissue or coagulation factors, which are not measured, change from subject to subject, and they induce a difference in the bleeding risk in a particular situation. The vWD should be kept in consideration as a significative risk<sup>14, 18</sup>.

The gene frequency of vWD in the Dobermann bred in USA is reported to be above 60%, but this number does not show the appropriate importance of the problem. From this estimation, it is possible to calculate the frequency of the several phenotypes in Dobermanns, using the Hardy-Weinberg law, since a gene frequency of 0.6 (namely 60% of genes are mutant) has been established in this breed. Indeed, about 36% are homozygotes and affected (double dose of mutated gene, with low



- the Canine von Willebrand Factor Gene Associated with Type III von Willebrand Disease. *Thromb Haemost*, 80: 332-337, 1998.
23. Slappendel RJ: von Willebrand's Disease in Dutch Kooiker Dogs. *Vet Quart*, 17: S21-S22, 1995.
  24. Slappendel RJ, Beijer EG, van Leeuwen M: Type III von Willebrand's disease in Dutch kooiker dogs. *Vet Quart*, 20 (3): 93-97, 1998.
  25. Stokol T, Parry BW, Mansell PD: von Willebrand's Disease in Scottish Terriers in Australia. *Aust Vet J*, 72: 257-262.
  26. Venta PJ, Li J, Yuzbasiyan-Gurkan V, et al.: Identification of a single-base deletion that causes Scottish Terrier von Willebrand's disease. *Anim Genetics* 27 (Suppl. 2), 49-50, 1996.
  27. Avgeris S, Lothrop CD, Mac Donald TP: Plasma von Willebrand Factor Concentration and Thyroid Function in Dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 196: 921-924, 1990.
  28. Moser J, Meyers KM, Meinkoth JH, et al.: Temporal Variation and Factors Affecting Measurement of Canine von Willebrand's Factor. *Am J Vet Res*, 57: 1288-1293, 1996a.
  29. Moser J, Meyers KM, Russon RH, et al.: Plasma von Willebrand factor Changes During Various Reproductive Cycle Stages in Mixed-breed Dogs with Normal von Willebrand Factor and in Doberman Pinschers with Type-I von Willebrand's Disease. *Am J Vet Res*, 59: 111-118, 1998.
  30. Dueland RT, Wagner SD, Parker RB: von Willebrand heterotopic osteochondrofibrosis in Doberman Pinschers: five cases (1980-1987) – *Jour Amer Vet Med Ass*, 197: 383-388, 1990.
  31. Johnstone IB, Crane S: Quantitation of Canine Plasma von Willebrand Factor Antigen using a Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Can J Vet Res*, 55: 11-14, 1991.
  32. Benson RE, Catalfamo JL, Dodds WJ: A Multispecies Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for von Willebrand's Factor. *J Lab Clin Med*, 119: 420-427.
  33. Slappendel RJ, Frielink RA, Mol JA, et al.: An Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for von Willebrand Factor Antigen (vWf-Ag) in Canine Plasma. *Vet Immunol Immunopathol*, 33: 145-154, 1992.
  34. Arnold S, Muller A, Binder H, et al.: von Willebrand Factor Concentrations in Blood Plasma of Bernese Mountain Dogs. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 139: 177-182, 1997.
  35. Callan MB & Giger U: Primary Hemostatic Defects in Dogs Assessed by a Point-Of-Care Instrument: Improved Function after Desmopressin in von Willebrand Disease. *Proc 18th ACVIM*, 737, Seattle WA, 2000.
  36. [WWW.vetgen.com](http://WWW.vetgen.com): home page.
  37. [WWW.geneseach.net](http://WWW.geneseach.net): home page.

to moderate risk of bleeding), 48% are carriers (one normal gene and one mutant gene, without any effective risk of bleeding), and 16% are homozygotes healthy (double dose of normal gene). From the results of the study on DNA technology, carried out on 3,207 Dobermanns, the values were the following: healthy 28.1%, carrier 48.9%, affected 23.0%. Therefore, the gene frequency of vWD gene was 0.474<sup>36</sup>.

Carriers of the mutant gene do not have the risk of bleeding for vWD, but obviously will transmit the mutant gene to their progeny with a probability of 50% of cases. Approximately, the ranges of vWF:Ag have been established, namely they are 5-20% for affected, 30-100% for carriers (heterozygotes), and 50-130% for the clear homozygotes. It should be noticed the high overlap between the range levels of carriers and clear animals.

This evidence should explain the inability of the vWF:Ag measure assay to identify the vWD Doberman carrier. The classification of dogs certainly affected remains is still valid when they have a vWF:Ag amount below 20%<sup>14, 18</sup>.

Therefore, the diagnosis of vWD in the dog is based on ELISA assays, to which the data from clinical findings, possible interference factors and other coagulation exams should be coupled. The genetic diagnosis obtained from the results of DNA technology is very useful and appropriate, but only in the breeds where these assays are available.