

Principali coagulopatie di origine ereditaria nel cane

RIASSUNTO

Sono descritte le più recenti acquisizioni sui due principali disturbi della coagulazione ereditari nel cane di razza, la malattia di von Willebrand e l'Emofilia A, nel cane di razza. Per ciascuna patologia coagulativa sono riportate l'eziopatogenesi, la sintomatologia clinica, la diagnosi e gli accertamenti di laboratorio e/o di natura molecolare che permettono un'appropriata profilassi eugenetica.

INTRODUZIONE

Nell'ambito delle coagulopatie ereditarie del cane rivestono un'importanza rilevante due principali disturbi dell'emostasi in cui è suggerito un intervento di eugenetica concordato tra allevatori, proprietari e ricercatori. Si tratta, della malattia di von Willebrand e dell'Emofilia A. Oltre a queste due malattie esistono una serie di altre patologie della coagulazione e più estensivamente del sistema emopoietico la cui natura genetica ed ereditaria è stata accertata, riassunte nella Tabella 1, che occorre considerare nell'allevamento in selezione.^{1,2,3,4,5}

MALATTIA DI VON WILLEBRAND

La malattia di von Willebrand (vWd) è dovuta alla deficienza del Fattore di von Willebrand (FvW) della coagulazione che ricopre un ruolo determinante sia nell'emostasi primaria che secondaria. È la coagulopatia ereditaria più diffusa nel cane ed è stata segnalata in oltre 54 razze.^{6,7,8,9,10}

La gravità della coagulopatia può essere molto variabile ed, in genere, i segni clinici interessano le mucose con epistassi, gengivorragie, ematuria e melena; meno frequentemente si osservano ematridi ed ematomi cutanei. Si può verificare claudicazione per emorragie a carico dei vasi muscolari e periostali e conseguente organizzazione degli ematomi. Di solito i sintomi della malattia si evidenziano durante gli interventi chirurgici anche di modesta entità.^{6,7,8,9,10}

La base genetica della malattia è una mutazione ereditaria a carico del gene vWd posto sugli autosomi, che si esprime fenotipicamente in tre tipi principali. Il tipo I (il più diffuso) riconosce una carenza generalizzata dei multimeri del fattore ed è trasmessa in modo autosomico dominante a penetranza incompleta. Il tipo II è caratterizzato da un difetto qualitativo in quanto mancano solo i multimeri a più alto peso molecolare ed è trasmesso in modo recessivo. Il tipo III è caratterizzato da una mancanza assoluta e generalizzata della proteina di FvW (è la forma più grave) ed è trasmessa in modo recessivo.^{6,7,8,9,10}

Alla base della diffusione della malattia sono la variabilità fenotipica della malattia, il grado di "sommersione" del gene e la difficoltà nell'individuazione dei soggetti portatori, in particolare impiegando test di quantificazione del FvW.

Al fine dell'individuazione dell'estensione della malattia in pazienti sospetti o con disturbi dell'emostasi è necessaria la valutazione di un profilo coagulativo comprendente numero di piastrine strumentale e con stima su vetrino, PT (Tempo di Protrombina), aPTT (Tempo di Tromboplastina Parziale attivato), fibrinogeno e la misurazione quantitativa dell'antigene FvW (FvW:Ag) effettuata con metodiche validate nella specie canina (FvW:Ag). I risultati della determinazione del FvW:Ag sono espressi in percentuale rispetto ad un pool di plasma normali e vanno correlati al BMBT (Buccal Mucosal Bleeding Time o tempo di sanguinamento alla mucosa buccale) o al test di aggregazione piastrinica (mediate vari agonisti, ad es. ADP o ristocetina).^{6,7,8,9,10,11} Di recente, anche l'uso di sofisticate strumentazioni (come ad es. il PFA-100) che valutano la fun-

George Lubas

DVM, Spec. MPA, Dipl. ECVIM-CA, Int Med
Dip. Clinica Veterinaria,
Via Livornese, lato monte
56122 San Piero a Grado, Pisa
Università di Pisa, Italia

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 02/03/2010 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 26/03/2010".

TABELLA 1
Elenco di alcune altre importanti malattie del sistema emopoietico di accertata natura ereditaria ove è disponibile un test di genetica molecolare*

Disturbi ereditari	Razze colpite con test disponibile	Test su DNA disponibile presso*
Patologie eritrocitarie		
Deficienza di piruvato chinasi (PK, pyruvate kinase)	Basenji, Eskimo, Beagle, Bassotto, West Highland White terrier, Cairn terrier	http://www.aht.org.uk http://www.vetdnacenter.com http://www.gtg.com.au http://www.healthgene.com http://research.vet.upenn.edu/penngen http://www.vetgen.com
Deficienza di fosfofruttochinasi (PFK, phosphofructokinase)	Springer Spaniel inglese, Cocker Spaniel americano, Cocker spaniel, Whippet, meticcio	http://www.aht.org.uk http://www.vetdnacenter.com http://www.gtg.com.au http://www.healthgene.com http://research.vet.upenn.edu/penngen http://www.vetgen.com
Patologie leucocitarie		
Deficienza di adesione leucocitaria (CLAD, canine leukocyte adhesion deficiency)	Setter irlandese, Setter bianco-rosso irlandese	http://www.aht.org.uk http://www.gtg.com.au http://www.healthgene.com
Emopoiesi ciclica (neutropenia ciclica)	Pastore Scozzese (Collie) a pelo liscio e ruvido	http://www.gtg.com.au http://www.healthgene.com http://www.vetgen.com
Patologie dell'emostasi		
Deficienza di fattore VII	Beagle, Deerhound scozzese, Alaskan Klee Kai, Airedale, Schnauzer gigante	http://research.vet.upenn.edu/penngen http://www.vetgen.com
Emofilia B (deficienza fattore IX)	Meticcio, Labrador retriever, Pointer tedesco a pelo duro, Bull terrier, Lhasa Apso	http://www.healthgene.com http://www.vetgen.com
Deficienza del fattore XI	Kerry Blue terrier	http://research.vet.upenn.edu/penngen

* L'indicazione ove eseguire il test è puramente indicativa e suscettibile di aggiornamenti considerato l'interesse sempre maggiore degli allevatori nell'identificare malattie genetiche e la disponibilità di nuovi laboratori di eseguire queste analisi in proprio o in 'service', cioè avvalendosi di laboratori referenziati a livello mondiale.

zionalità piastrinica sono stati impiegati come mezzo di screening e di ausilio nella diagnosi di una possibile malattia di vWD.¹¹ Esistono anche accertamenti di biologia molecolare che permettono di identificare la malattia in alcune razze ed in particolare l'assetto genetico esatto (omozigote o eterozigote) dei malati e dei portatori (vedi Tab. 2).

Uno dei più importanti centri per questo tipo di diagnostica molecolare (VetGen) ha pubblicato sul suo sito web i risultati delle indagini compiute per gli accertamenti sulla malattia di von Willebrand di tipo I e di tipo III nelle razze ove queste analisi sono disponibili (vedi Tab. 3).¹² Ovviamente con questi accertamenti è possibile con assoluta certezza identificare i soggetti esenti da questa malattia. Per le altre razze dove non è disponibile il test su DNA occorre effettuare il dosaggio del FvW:Ag in condizioni ottimali ove si abbia cura di evitare tutti i fattori pre-analitici fonte di errate misurazioni.^{7,11}

EMOFILIA A

L'Emofilia A è dovuta alla deficienza del Fattore VIII ad attività procoagulante (FVIII:C) ed è la seconda

coagulopatia ereditaria più diffusa in varie razze di cani.^{9,13,14,15}

La gravità dei sintomi clinici è in relazione all'attività funzionale del FVIII:C presente nel soggetto in esame, per questo si evince l'importanza della valutazione quali-quantitativa dello stesso. Con un'attività funzionale del FVIII:C inferiore al 2% le manifestazioni cliniche sono estremamente gravi, caratterizzate da prolungati sanguinamenti anche dopo traumi lievi, ematridi e raccolte cavitari; tra il 2 e il 15% di attività la sintomatologia è modesta con sanguinamenti dopo traumi e interventi chirurgici mentre tra il 15 e il 25% il sanguinamento è raro e si verifica dopo traumi gravi e chirurgia impegnativa.^{9,13,14,15}

L'ereditarietà della malattia è recessiva legata al sesso (eterocromosomi) con penetranza ed espressività variabile e si osservano le seguenti combinazioni genotipiche:

- maschi emofilici, emizigoti (frequenti): cromosoma Y normale/cromosoma X malato,
- femmine portatrici, eterozigoti (frequenti): cromosoma X normale/cromosoma X malato,
- femmine emofiliche, omozigoti (rari): cromosoma X malato/cromosoma X malato.

TABELLA 2
Elenco di laboratori o aziende in cui è disponibile un accertamento di origine molecolare per la malattia di von Willebrand*

Nome azienda/laboratorio, Nazione, Sito web	Malattia diagnosticata	Razze ove è possibile il test genetico
Animal Health Trust, Regno Unito http://www.aht.org.uk	Malattia di von Willebrand	Setter irlandese, Setter bianco-arancio
http://diagnostics.finnzymes.fi Finnzymes diagnostics, Finland	Malattia di von Willebrand, tipo I	Dobermann, Manchester terrier, Bernese, Barboncino, Kerry Blue terrier, Pembroke Welsh Corgi, Papillon
	Malattia di von Willebrand, tipo II	Boxer, Pointer tedesco a pelo duro, Pointer Tedesco a pelo corto, Kooiker
Genetic technologies Limited, Australia http://www.gtg.com.au	Malattia di Von Willebrand tipo I, II e III	Terrier Australiano, Bernese, Dobermann, Papillon, Pembroke Welsh Corgi, Pastore delle Shetland, Barboncino (Standard), Scottish terrier
VetGen, Veterinary Genetic Services, USA http://www.vetgen.com	Malattia di von Willebrand, tipo I	Bernese, Coton de Tulear, Dobermann, Drentsche Patrijshond, Pinscher Tedesco, Kerry Blue terrier, Manchester terrier, Papillon, Pembroke Welsh Corgi, Barboncino, Stabyhoun
	Malattia di von Willebrand, tipo II	Drahthaar tedesco, Pointer Tedesco a pelo corto, Pointer tedesco a pelo duro, Pointer
	Malattia di von Willebrand, tipo III	Scottish terrier, Pastore delle Shetland, Kooikerhondje
Laboklin, Labor fur Klinische Diagnostik GMBH & CO, Germania http://www.laboklin.de	Malattia di von Willebrand, tipo I Malattia di von Willebrand, tipo II Malattia di von Willebrand, tipo III	Dobermann, Barboncino, Manchester terrier Pointer tedesco a pelo duro Scottish terrier, Pastore delle Shetland

* In realtà anche in Italia vi sono laboratori che sono in grado di eseguire questi accertamenti di carattere genetico come ad es. IDEXX Vet•Med•Lab, Genefast srl e Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco.

TABELLA 3
Indagini sul genotipo della malattia di von Willebrand di tipo I e di tipo III (fonte da sito web VetGen aggiornato al Gen. 2005 e al Lug. 2008)

Razze indagate	Esente (%)	Portatore (%)	Malato (%)
Malattia di von Willebrand di tipo I			
Bernese	83,0	16,0	1,0
Dobermann	25,0	49,0	26,0
Manchester Terrier	59,0	37,0	4,0
Pembroke Welsh Corgi	57,0	37,0	6,0
Barboncino	90,0	9,0	1,0
Malattia di von Willebrand di tipo III			
Scottish Terrier	89,7	10,0	0,3
Pastore delle Shetland	90,3	9,4	0,3

Possono, quindi, trasmettere la malattia i maschi emofilici e le femmine portatrici. Le femmine emofiliche sono estremamente rare poiché derivano dall'incrocio di un padre emofilico e una madre portatrice.

Tutti i figli maschi di un padre emofilico non sono emofilici e le figlie femmine sono tutte portatrici; i figli maschi di una madre portatrice saranno per metà emofilici e per metà indenni, le figlie femmine per metà portatrici e per metà indenni. Gli eterozigoti asintomatici (femmine) costituiscono, pertanto, una riserva genetica della malattia.^{9,13,14,15}

Mentre gli esami della coagulazione, compresa la determinazione quantitativa del fattore VIII, identificano chiaramente i maschi malati, altrettanto non avviene per le femmine portatrici dove esiste un'ampia variabilità nell'espressione del FVIII:C e quindi la sua misurazione nel plasma può solo fornire una probabilità statistica della condizione dell'animale.^{9,13,14,15}

Al fine di individuare la diffusione della malattia è necessaria la valutazione di un profilo coagulativo comprendente numero di piastrine strumentale e con stima su vetrino, PT, aPTT, fibrinogeno e misu-



FIGURA 1 - Cane Terranova, maschio, di 13 mesi di età, con evidente epistassi tipica della malattia di von Willebrand di tipo I in forma grave.



FIGURA 2 - Cane pastore Tedesco, maschio, di età inferiore ad un anno affetto da Emofilia A che presenta una tumefazione sulla testa dovuta ad un ematoma creatosi per un trauma lieve, inizialmente scambiato per ascesso.



FIGURA 3 - Campioni fecali di cane, in quello di destra si nota un'evidente melena tipica di una coagulopatia grave.

razione dell'attività del FVIII:C (in percentuale rispetto ad un pool di plasma normali).^{9,13,14,15}

Per mettere in pratica un piano di selezione genetica il profilo coagulativo deve essere messo in relazione al pedigree. Qualora siano diagnosticati nuovi casi è suggerito che, oltre al soggetto colpito, siano esaminati con il profilo coagulativo completo anche i genitori, i nonni e fratelli di cucciolata.^{9,13,14,15}

Al momento attuale non esistono test genetici di biologia molecolare disponibili in grado di aiutare nella selezione contro questa malattia, ma una recente pubblicazione ha individuato la possibilità di identificare indirettamente i portatori in almeno sei razze (Border terrier, Pug, Chihuahua, San Bernardo, Rough collie, Samoiedo).¹⁴

MODALITÀ DI ACCERTAMENTO DELLE PATOLOGIE COAGULATIVE EREDITARIE

Queste istruzioni sono necessarie per avviare un campione biologico (plasma citrato) di un soggetto in accertamento per determinare la sua funzione coagulativa. Si raccomanda di consultare sempre le istruzioni fornite dal laboratorio che esegue l'analisi.⁸

1. I campioni di sangue devono essere prelevati con siringhe monouso dalla vena cefalica dell'arto anteriore o meglio dalla vena giugulare. Si consiglia di scartare il sangue che proviene da prelievi difficoltosi che possono determinare attivazione dei fattori della coagulazione.
2. Un'aliquota di sangue (in genere 2,25 ml) deve essere posta, previa rimozione dell'ago dalla siringa, nella provetta contenente citrato di sodio al 3,8%. Il contenuto totale di sangue più anticoagulante della provetta è circa 2,5 ml.
3. La provetta va agitata delicatamente per inversione per miscelare bene sangue e anticoagulante.
4. Un'aliquota di sangue (in genere 1-2 ml) deve essere posta, previa rimozione dell'ago dalla siringa, in una provetta contenente K3 EDTA.
5. La provetta va agitata delicatamente per inversione (vedi punto 3).

6. La provetta con citrato di sodio, entro 1 ora dal prelievo, deve essere centrifugata a 2500 giri per 10 minuti, per ottenere il plasma citrato.
7. Il plasma va trasferito in una provetta di plastica tipo Eppendorf contrassegnata col nome del proprietario e del cane, tappata e sigillata con cerotto o nastro adesivo. Quantità minima 1 ml. Devono essere scartati campioni itterici, emolitici o lipemici.
8. È possibile conservare entrambe le provette (plasma e sangue intero) a +4/6°C (frigorifero) al massimo per tre giorni.
9. Le provette devono essere accompagnate dal modulo che certifichi l'avvenuto prelievo controfirmato dal proprietario e dal veterinario che ha eseguito il prelievo.
10. La spedizione dei campioni al laboratorio di riferimento deve avvenire nell'apposita scatola di polistirolo in cui è stato posto almeno un pannello di ghiaccio preventivamente congelato (siberino).
11. La spedizione deve avvenire con corriere veloce che garantisca la consegna al laboratorio di riferimento entro 24 ore.

CONCLUSIONI

Le analisi quantitative sui fattori della coagulazione sono suscettibili di variazioni individuali legate a condizioni fisiologiche e/o patologiche e di possibili errori pre-analitici, analitici e post-analitici, incorsi nella procedura di raccolta, esecuzione e valutazione dell'analisi. Pertanto, qualora il campione inviato al laboratorio di riferimento evidenzia un valore riferibile alla presenza di malattia è suggerito di far rivalutare il soggetto presso una struttura veterinaria di riferimento per una visita clinica e l'esecuzione di un adeguato pannello di esami di laboratorio che includa la ripetizione delle analisi sulla coagulazione. Nel caso siano disponibili test di biologia molecolare come nel caso della malattia di von Willebrand (solo per le razze segnalate), previo consulto con il laboratorio che si incarica dell'analisi, è possibile



FIGURA 4 - Radiografia del bacino di un cane di razza Springer Spaniel femmina affetto da malattia di von Willebrand di tipo I in forma moderata che evidenzia nel femore destro, parte mediale, un progressivo ematoma organizzato.



FIGURA 5 - Radiografia dell'articolazione del ginocchio di un cane di razza Leonberger di circa 6 mesi, maschio affetto da Emofilia A in forma grave in cui si evidenzia un versamento intraarticolare (ematro). (Foto gentilmente messa a disposizione dal Dr. Aldo Vezzoni)

Parole chiave

Coagulopatie, ereditarie, malattia di von Willebrand, Emofilia A, cane, profilassi.

■ **Main inherited coagulation disorders of the dog**

Summary

The most recent knowledge in two main inherited coagulation disorders, the von Willebrand disease and the Hemophilia A, in the purebred dog are reported. For each coagulation disorder etiopathogenesis, clinical symptoms, diagnosis and laboratory and molecular investigations that allow the appropriate eugenic prevention are reported.

Key words

Coagulopathies, inherited, vonWillebrand disease, Hemophilia A, dog, prevention.

raccogliere un campione di sangue intero in EDTA, o un tampone citologico dalla cavità orale o un campione di peli con bulbo pilifero. Si rammenta che queste analisi molecolari possono essere compiute anche sui campioni biologici conservati nei laboratori riconosciuti dall'Ente Nazionale Cinofilia Italiana, senza la necessità di ulteriori prelievi.¹⁶ Sfortunatamente in Europa, seppure esista un vasto progetto per associare le malattie con il background genetico, le coagulopatie ereditarie non sono state incluse in queste indagini.¹⁷

BIBLIOGRAFIA

1. Binns M: Lo screening genetico nel cane. *Waltham Focus* 17:18-24, 2007.
2. Sargan DR: IDID: Inherited Diseases in Dogs: Web-based information for canine inherited disease genetics. *Mamm Genome* 15:503-506, 2004.
3. URL: Canine Inherited Disorders Database. Available at: <http://www.upei.ca/cidd/intro.htm> (rev. Dec. 29th, 2004). Accesso al sito 13 febbraio 2010.
4. URL: OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals. Available at <http://omia.angis.org.au/browse.shtml>. Accesso al sito 13 febbraio 2010.
5. URL: University of Cambridge, Cambridge Veterinary School, Inherited diseases in dogs. Available at: <http://server.vet.cam.ac.uk/index.html>. Accesso al sito 13 febbraio 2010.
6. Denis CV, Wagner DD: Insights from von Willebrand disease animal models. *Cell Mol Life Sci* 56: 977-990, 1999.
7. Brooks M: A review of canine inherited bleeding disorders: biochemical and molecular strategies for disease characterization and carrier detection. *J Hered* 90:112-118, 1999.
8. Brooks M, Raymond S, Catalfamo J: Plasma von Willebrand 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.
9. Stefanon G, Stefanon B, Stefanon G: Inherited and acquired canine bleeding disorders in Northeastern Italy. *Canine Pract* 18:15-23, 1993.
10. Gavazza A, Lubas G, Caldin M, et al: La Malattia di Von Willebrand. I. Casistica personale nel cane allevato in Italia. *Veterinaria* 16:1-13, 2002.
11. Burgess HJ, Woods JP, Abrams-Ogg ACG, et al: Evaluation of laboratory methods to improve characterization of dogs with von Willebrand disease. *Can Jour Vet Res* 73:252-259, 2009.
12. URL: vetGen, Veterinary Genetic Services, Canine. Available at: <http://www.vetgen.com/canine-services.html>. Accesso al sito 13 febbraio 2010.
13. Tennant B: The problem of inherited diseases. 3: Haemophilia in the German Shepherd. *J Small Anim Pract* 37:405-406, 1996.
14. Brooks MB, MacNguyen R, Hall R, et al: Indirect carrier detection of canine haemophilia A using factor VIII microsatellite markers. *Anim Genetics* 39: 278-293, 2008.
15. Mansell P: Hemophilia A and B. In: Schalm's Veterinary Hematology. Ed BF Feldman, Zinkl JG, Jain NC. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000, pp 1026-1029.
16. URL: Ente Nazionale Cinofilia Italiana, La riproduzione selezionata, I laboratori riconosciuti dall'ENCI per il deposito del campione biologico. Available at: http://www.enci.it/news/laboratori_biologico.php. Accesso al sito 13 febbraio 2010.
17. URL: LUPA, Unravelling common human diseases using dog genetics. Available at: <http://www.eurolupa.org>. Accesso al sito 13 febbraio 2010.