

L'EPIDERMOLISI BOLLOSA GIUNZIONALE EREDITARIA NEL CANE: DIAGNOSI MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PORTATORI SANI DELLA MALATTIA

CANINE INHERITED JUNCTIONAL EPIDERMOLYSIS BULLOSA: MOLECULAR DIAGNOSIS FOR HEALTHY CARRIER IDENTIFICATION

MICHELE POLLI, Med. Vet., PhD

Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Milano - Vetogene Lab - Milano

BARBARA BIGHIGNOLI, PhD

Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Milano - Vetogene Lab - Milano

MARIA GIUSEPPINA STRILLACCI

Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Milano - Vetogene Lab - Milano

CORRADO GILARDONI, Med. Vet.

Libero professionista, Cernobbio (CO)

CESARE BONASEGALE, Med. Vet.

Consigliere Kurzhaar Club Italiano

LUIGI GUIDOBONO CAVALCHINI, Med. Vet.

Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Milano - Vetogene Lab - Milano

MARIA LONGERI, Med. Vet., PhD

Dipartimento di Scienze Animali - Università degli Studi di Milano - Vetogene Lab - Milano

Riassunto

L'Epidermolisi Bollosa Giunzionale nel cane (EBG) è una malattia ereditaria, autosomica recessiva caratterizzata clinicamente dalla formazione di vescicole e bolle ad insorgenza spontanea o conseguenti a traumi anche di lieve entità. Le lesioni si manifestano soprattutto a livello del cuscinetto plantare, sulla superficie interna del padiglione auricolare, e a livello dell'estremità terminale della coda e dei punti di maggior pressione nell'estremità distali degli arti. Il *Bracco Tedesco* (Kurzhaar) è la razza predisposta allo sviluppo di tale malattia.

Gli autori descrivono un metodo di PCR allele-specifica (*Polymerase Chain Reaction*) per l'individuazione molecolare dell'alterazione genetica responsabile della malattia (EBG). Tale metodo è basato sull'identificazione della mutazione causativa all'interno del gene che codifica per una subunità della laminina 5 (LAMA 3) e che permette il riconoscimento dei portatori sani.

Summary

Canine Junctional Epidermolysis Bullosa (JEB) is an inherited autosomal recessive disease which expression is characterized by skin blistering in different body regions. The disease is clinically characterized by a bullous and ulcerative dermatitis. The disease causes a general fragility of the skin leading to the formation of the spontaneous or traumatically induced blisters and ulcers on footpads, ear surface, tail tips and pressure points on the distal limbs. The German Shorthaired Pointer (Kurzhaar) is predisposed.

The authors describe an allele-specific PCR (Polymerase Chain Reaction) for the molecular detection of the genetic mutation in the laminin 5 subunit gene (LAMA 3) which allows the identification of healthy carriers of JEB.

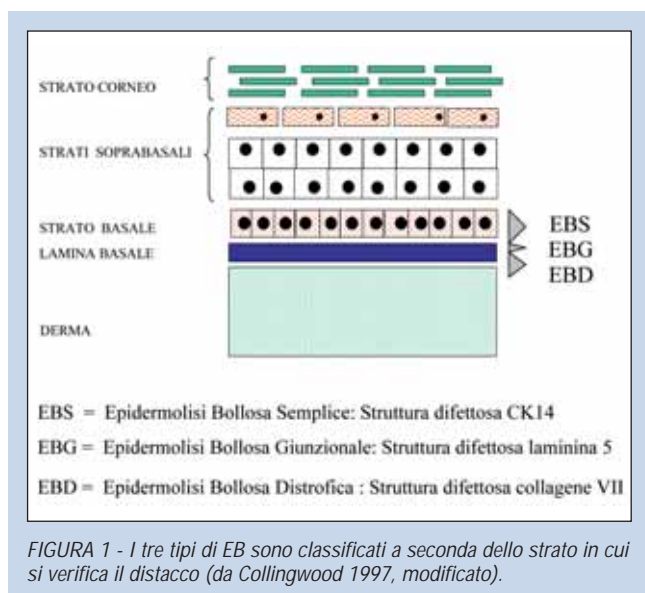
INTRODUZIONE

L'epidermolisi bollosa (EB) è una malattia ereditaria della cute che colpisce l'uomo e, tra gli animali domestici, il cavallo, il bovino, alcune razze canine e il gatto¹.

La malattia, sia nell'uomo che negli animali, è caratterizzata dalla formazione di vescicole spontanee o conseguenti a traumi, anche di lieve entità, a livello della cute e delle mucose².

Nell'uomo esiste un'ampia letteratura a proposito dell'EB: sono state classificate forme di EB semplice (EBS), forme di tipo giunzionale (EBG) e distrofico (EBD). La classificazione nei tre gruppi si basa sulla localizzazione del

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 24/10/2006 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 26/09/2007".



difetto strutturale a livello di giunzione dermo-epidermica, che porta al distacco dell'epidermide dal derma sottostante: a) forme intraepidermiche (semplici e non cicatriziali), b) forme giunzionali (distacco a livello della *pars lucida*), c) forme dermolitiche o distrofiche (distacco sotto la lamina basale)³ (Fig. 1).

La forma più frequentemente descritta nel cane è quella cosiddetta "giunzionale" (EBG)², anche se è riportata in letteratura una forma "distrofica" (EBD) nell'Akita-Inu e nel Golden Retriever^{4,5}.

EZIOLOGIA

L'epidermolisi bollosa nel cane è una malattia ereditaria a carattere autosomico recessivo di cui sono state descritte varianti letali e non letali². Quando la malattia si manifesta nella cucciolata, entrambi i genitori sono portatori. È una malattia "monogenetica": la causa è una semplice mutazione a livello di un unico gene. Questa alterazione determina, a livello cutaneo, la mancata espressione di una proteina strutturale (forme solitamente letali) o una ridotta espressione di una proteina strutturale (forme non letali)⁶.

Nelle forme letali i soggetti ammalati muoiono spesso durante le prime settimane di vita.

L'impiego negli anni di riproduttori portatori della malattia, ritenuti importanti sulla base di altre caratteristiche fenotipiche, è stato determinante per la diffusione dell'EB nell'ambito della razza. Gli accoppiamenti tra parenti e una elevata consanguineità, portano infatti all'omozigosi e all'espressione fenotipica di geni recessivi.

MODALITÀ DI TRASMISSIONE

L'EBG è la tipica malattia ereditaria a comportamento recessivo (Tabella 1):

- La patologia si manifesta solo negli omozigoti recessivi "aa" (malati).
- I soggetti "Aa", fenotipicamente sani, sono portatori della malattia e possono trasmetterla ai figli.

Tabella 1
Possibili accoppiamenti tra soggetti sani e/o portatori, percentuali genotipiche e fenotipiche attese

Accoppiamento	Genotipo genitori	Progenie attesa (%)		
		AA (sani)	Aa (portatori)	aa (malati)
1° caso	AA × AA	100	–	–
2° caso	AA × Aa	50	50	–
3° caso	Aa × Aa	25	50	25

- L'allele "a" permane nella popolazione e viene trasmesso grazie ai portatori "Aa".
- La riproduzione dei soggetti sani di cui non si conosca l'assetto genetico, comporta la messa in atto nella razza di 3 tipi di accoppiamenti.

Come indicato in Tabella 1, nel primo caso si ottiene una progenie costituita al 100% da soggetti esenti dalla patologia, tutti i figli sono infatti omozigoti dominanti "AA" e non è mai presente l'allele difettoso "a". Nel secondo caso si ottiene una progenie al 100% esente dalla patologia, ma per metà portatrice dell'allele difettoso. I soggetti "Aa" sono infatti apparentemente sani, ma saranno responsabili nei successivi accoppiamenti del trasferimento alla progenie dell'allele difettoso "a". Il terzo caso è l'accoppiamento che crea il danno maggiore all'allevamento, in questo caso avremo infatti solo il 25% di probabilità di ottenere una progenie "AA", mentre avremo il 50% di portatori "Aa", e il 25% di soggetti malati "aa".

L'epidermolisi bollosa è una malattia difficilmente eradicabile dall'allevamento con le tecniche diagnostiche tradizionali, che permettono il riconoscimento dei soli soggetti malati, ma non dei portatori.

RAZZE CANINE INTERESSATE

L'epidermolisi bollosa è una tipica dermatosi "razziale", perché si presenta esclusivamente in alcune razze canine.

La forma EBG colpisce prevalentemente il cane da ferma tedesco a pelo corto, il Bracco Tedesco (Fig. 2).

Fino ad oggi il Laboratorio di genetica molecolare Labogena (Labogena, Domaine de Vilvert 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France) è stato l'unico laboratorio europeo di riferimento per l'esecuzione di un test molecolare in grado di rilevare la mutazione del gene della laminina 5. In Francia il test è obbligatorio nel Bracco Tedesco per l'identificazione dei portatori sani. Recentemente la rivista del "Club Francaise du Braque Allemand"⁷, dove vengono pubblicati annualmente i dati elaborati dal Laboratorio Labogena, ha riportato una prevalenza di positività all'esame genetico nel Bracco Tedesco (unica razza controllata a livello di club) di circa il 13-15%, con un dato europeo che si attesta sul valore del 13%. Questo valore deve essere considerato una proiezione ottimistica sulla popolazione totale italiana, in quanto nel nostro paese attualmente vengono testati solo l'1% dei soggetti di questa razza⁸.

Oltre al Bracco Tedesco le lesioni cutanee riferibili ad



FIGURA 2 - Cane da ferma tedesco a pelo corto (Bracco Tedesco o Kurzhaar).

EBG sono state segnalate anche in un Barbone Toy⁹ e, nella forma non-letale, in un meticcio⁴.

Le altre forme di EB, meno diffuse, sono state segnalate nel Collie e nello Shetland (EBS)¹⁰, anche se in seguito alcuni autori hanno considerato queste segnalazioni come casi di dermatomiosite di grado lieve in assenza di lesioni muscolari, e nel Beauceron² nel Golden retriever e nell'Akita-inu¹¹ (EBD). Quest'ultima forma è di particolare interesse per i genetisti umani perché la sequenza del gene interessato (COL7A1) è molto simile a quello dell'uomo¹¹.

ESAME CLINICO E ISTOPATOLOGICO

I segni principali della EBG nel cane sono rappresentati da vescicole ed erosioni cutanee che, con l'età possono anche regredire. I cuccioli sviluppano già alla nascita delle vescicole che successivamente si trasformano in ulcere profonde. Le aree più interessate sono i cuscinetti plantari (Fig. 3), la cute che riveste le prominenze ossee, le parti distali degli arti soggette a pressione, la regione genitale, la cute del padiglione auricolare e la mucosa orale².

Le vescicole spesso scaturiscono da minimi traumi e pertanto in teoria possono colpire tutte le regioni cutanee o mucose. Spesso i cuccioli vengono soppressi poche ore dopo la nascita².

L'esame istopatologico delle biopsie in sede perilesionale evidenzia una fissurazione in corrispondenza della giunzione dermo-epidermica con distacco netto a livello della membrana basale (Figg. 4 e 5). Se il prelievo viene effettuato nelle aree ulcerate la lesione può essere difficile da rilevare in quanto l'area risulta completamente disepiteliz-



FIGURA 3 - Erosioni ulcerative calde e dolenti dei cuscinetti plantari tipiche dell'epidermolisi bollosa.

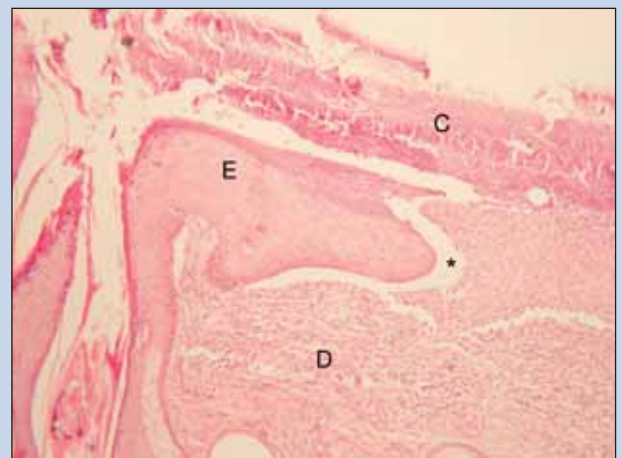


FIGURA 4 - Regione del gomito (Bracco Tedesco): iperplasia dell'epidermide (E), con completo distacco (*) dal derma (D) a livello della membrana basale, crosta sierocellulare (C) che riveste le zone ulcerate. Colorazione Ematossilina - Eosina (100 X).

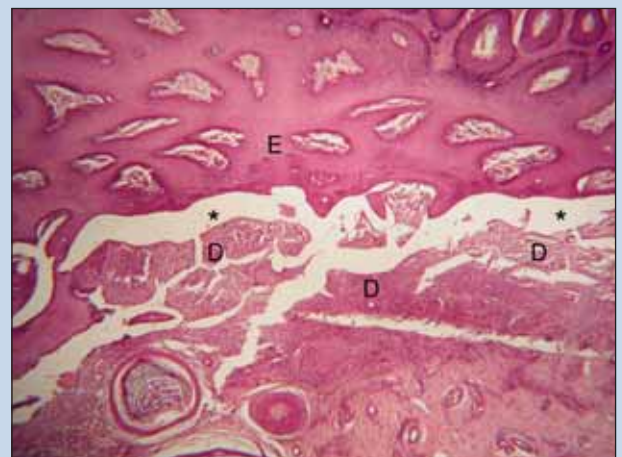


FIGURA 5 - Cuscinetto plantare (Bracco Tedesco): le lesioni di distacco dermoepidermico sono presenti anche nel cuscinetto plantare. E: epidermide, D: derma, *: distacco dermoepidermico. Colorazione Ematossilina - Eosina (100 X).

zata e ricoperta da spesse croste sierocellulari. Nel derma si osserva infiltrato neutrofilico e fibroplasia, gli annessi sono normali.

Queste lesioni predispongono ad una sovrainfezione secondaria spesso causa di setticemia.

In generale la diagnosi di EB, si basa su anamnesi, segnalamento ed esame istologico. Per aumentare la sensibilità diagnostica dell'esame istopatologico, è estremamente importante effettuare campionamenti multipli ai margini delle ulcere e nelle aree perilesionali non ulcerate.

La diagnosi istopatologica consente di identificare la lesione come "malattia della giunzione", ma non di specificare di quale delle tre forme (semplice, giunzionale e distrofica) si tratti, consente inoltre di poter emettere una diagnosi nei soggetti malati, ma non rende possibile l'identificazione dei portatori "Aa" e pertanto non garantisce l'eradicazione della malattia dalla razza.

Diagnosi molecolare

In questi ultimi anni la possibilità di effettuare analisi sul DNA ha consentito la comprensione molecolare delle basi genetiche di questo disordine ereditario. Le mutazioni identificate a livello del DNA nell'uomo coinvolgono diversi geni tra cui i geni della cheratina 14 per l'EBS¹², della laminina 5 per l'EBG¹³ e del collagene tipo VII per l'EBD¹⁴.

In cani con EBG lo studio del DNA ha rilevato una mutazione che condiziona, in assetto omozigote, un difetto nella sintesi della laminina 5 causando una grave anomalia a livello dell'adesione cellulare dell'epidermide al derma sottostante. In particolare nel Bracco Tedesco la mutazione identificata è un'inserzione di una sequenza "satellite" a livello del gene che codifica per una subunità della laminina 5 (LAMA3)⁶.

Gli autori hanno messo a punto, e sottoposto a brevettazione¹⁵, un efficace test diagnostico per l'identificazione di soggetti portatori. A tal proposito è stato allestito un protocollo di PCR per l'amplificazione specifica dell'allele sano e dell'allele malato del gene LAMA3, a partire da DNA estratto da sangue. Su un gel di agarosio dopo elettroforesi, il DNA dei cani portatori (eterozigoti) presenterà 2 amplificati, uno dell'allele sano e uno dell'allele malato, mentre quello dei non portatori (omozigoti per l'allele sano) presenterà un unico amplificato (Fig. 6).

L'analisi del DNA, permettendo di riconoscere i soggetti sani dai soggetti portatori in età precoce, rende possibile l'attuazione di programmi selettivi per la completa eradicazione della malattia nelle principali razze canine interessate.

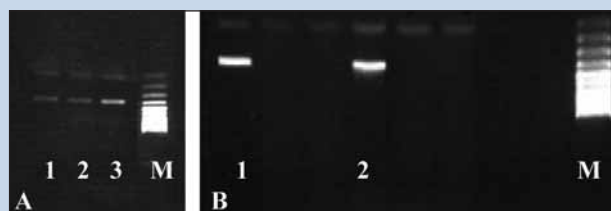


FIGURA 4 - Gel elettroforesi in agarosio: visualizzazione del prodotto di PCR (Polymerase chain reaction).

M = Marcatore di peso molecolare (i pesi molecolari non sono indicati in figura perché è in atto una procedura di brevettazione).

A. Corsie 1, 2, 3 = Animali Portatori. Sono presenti per ciascun soggetto due bande di amplificato specifiche di intensità paragonabile.

B. Corsie 1 e 2 = Animali Sani non portatori. Per ciascun soggetto è presente un solo amplificato specifico.

TERAPIA

Come nell'uomo anche nel cane non esiste trattamento tradizionale specifico per questo tipo di malattia. In futuro forse sarà possibile intraprendere tentativi di cura attraverso la "terapia genica". A tale proposito, soprattutto la razza "Golden Retriever", che presenta la forma di tipo "Distrofico", e il Bracco Tedesco, per la forma "Giunzionale", sono state scelte come modello di studio per la terapia genica nell'uomo^{5,16}.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro attraverso l'analisi del DNA nel Bracco Tedesco, introduce la possibilità di riconoscere i soggetti portatori "Aa" dell'EBG, consentendo l'attuazione di programmi selettivi che mirino all'eradicazione della malattia. In tali programmi esiste anche la possibilità di "gestire la malattia" all'interno dell'allevamento, procedendo in modo graduale alla sua completa eliminazione. L'allevatore, potendo con un semplice prelievo di sangue in EDTA conoscere in anticipo il genotipo dei suoi cani - sani "AA", portatori sani "Aa" e malati "aa" - può permettersi di programmare gli accoppiamenti in modo da non ottenere mai nella progenie dei soggetti malati.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Dott.ssa Chiara Noli (Laboratorio di Analisi Veterinarie BiEsseA - Milano) per la refertazione, la descrizione istopatologica, la documentazione fotografica e il fondamentale contributo nella redazione del testo inerente la descrizione delle lesioni istopatologiche.

Parole chiave

Cane, epidermolisi bollosa giunzionale, membrana basale, laminina-5, collagene, DNA, Kurzhaar, Bracco tedesco.

Key words

Dog, junctional epidermolysis bullosa, basement membrane, laminin-5, collagen, DNA, Kurzhaar, German pointer.

Bibliografia

1. Olivry T, Dunstan SM, Marinkovich MP: Reduced anchoring fibril formation and collagen VII immunoreactivity in feline dystrophic epidermolysis bullosa. Vet. Pathol. 36: 616 - 618, 1999.
2. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: Epidermolysis bullosa. In: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology 6th Ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 2001, pp 938-940.
3. Collingwood D, Hwang D, Mehn J: Epidermolysis Bullosa Simplex: The Cytoskeleton. Biology 401, 1-7, 1997. Documento consultabile in rete all'indirizzo: <http://www.math.washington.edu/~colling/Biology/paper2.html>.
4. Nagata M, Iwasaki T, Masunaga T et al.: Non lethal Junctional Epidermolysis bullosa in a dog. Br. J. Dermatol. 137: 445-9, 1997.
5. Magnol JP, Pin D, Palazzi X, et al: Characterization of a canine model of Dystrophic Bullous Epidermolysis (DBE). Development of a gene therapy protocol. Bull. Acad. Natl. Med. 189: 107-19, 2005.

6. Capt A, Spirito F, Guaguere E et al: Inherited Junctional Epidermolysis Bullosa in the German Pointer: Establishment of a Large Animal Model. J. Invest. Dermatol. 124: 530, 2005.
7. Club français du braque allemand: Epidermolyse Bulleuse Junctionnelle: mise en place d'un dépistage systématique. Annuaire d'élevage: 12-13, 2003.
8. Bonasegale C.: Epidermolisi bollosa: la «produzione selezionata» e l'analisi del DNA. Il giornale del Kurzhaar 1: 1-5, 2007 (rivista on line, <http://www.giornaledelkurzhaar.it/epider.pdf>).
9. Dunstan RW, Sills RC, Wilkinson JE et al: A disease resembling Junctional Epidermolysis Bullosa in a toy poodle. Am. J. Dermatopathol. 10: 442-447, 1998.
10. Scott DW, Schultz RD.: Epidermolysis bullosa simplex in the Collie dog. JAVMA. 171: 721-7, 1977.
11. Palazzi X, Marchal T, Chabanne L et al: Inherited Dystrophic Epidermolysis Bullosa in Inbred Dogs: a spontaneous animal model for somatic gene. J. Invest. Dermatol. 115: 135-137, 2000.
12. Chen H, Bonifas JM, Mstsumura K et al: Keratin 14 gene mutations in patients with Epidermolysis Bullosa Simplex. J. Invest Dermatol. 105: 629-632, 1995.
13. Nakano A, Chao SC, Pulkkinen L et al: Laminin 5 mutations in Junctional Epidermolysis Bullosa: molecular basis of Herlitz vs non-Herlitz phenotypes. Hum. Genet. 110(1): 41-51, 2002.
14. Christiano AM, Suga Y, Greenspan DS et al: Premature termination codons on both alleles of the type VII collagen gene (COL7A1) in three brothers with recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. J. Clin. Invest. 95: 1328-1334, 1995.
15. Brevetto per invenzione industriale avente per titolo: "metodo per la determinazione dell'epidermolisi bollosa giunzionale nel cane" a nome: 1. Università degli Studi di Milano; 2. Vetogene srl depositata in data 11 gennaio 2007, presso l'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi la domanda di brevetto N. MI2007A000036.
16. Jiang QJ, Uitto J: Animal models of Epidermolysis Bullosa- Targets for Gene Therapy. The J. Invest. Dermatol. 124: Comment xi, 2005.

CAB ABSTRACTS



CAB Abstracts è il database bibliografico più grande al mondo nel settore della medicina veterinaria.

CAB Abstracts, coprendo praticamente tutte le pubblicazioni scientifiche mondiali (riviste e atti congressuali) di medicina veterinaria, permette di fare ricerche bibliografiche complete e mirate. A differenza di PubMed, il data base gratuito finanziato dal Governo Americano che copre prevalentemente la medicina umana, l'accesso a CabAbstract normalmente non è libero ma prevede un abbonamento individuale. Da quest'anno questo servizio straordinario è offerto gratuitamente ai soci delle Società SCIVAC, SIVAR, SIVE, SIVAE, SIVAL, AIVEMP ed ai soci delle Società Specialistiche SCIVAC e SIVE in regola con il pagamento della quota associativa per l'anno in corso. Per accedere al servizio è necessario entrare nella propria pagina di Ego al sito <http://ego.evsrl.it> tramite le user name e password stampate su tutte le ricevute di iscrizioni associative o versamento di caparre rilasciate da EV. Se hai smarrito o non hai mai ricevuto il nome utente e la password per accedere a Ego, puoi riceverla compilando il box on line apposito nel sito <http://ego.evsrl.it> o scrivendo a info@scivac.it o telefonando alla Segreteria EV allo 0372 46040.

IMPORTANTE: il servizio funziona solo se il browser consente l'apertura delle finestre a comparsa (popup).

È quindi necessario disattivare, PRIMA di effettuare l'accesso, qualsiasi strumento di blocco popup (ad es.: blocco popup di Internet Explorer, Google Toolbar, Yahoo Toolbar; funzione "Blocca finestre a comparsa" di Safari, nel menu "Safari"; etc.).

Dentro ogni cane obeso
c'è un cane in piena forma.



amodo.it 030.Lu07

MARCHIO REGISTRATO

Yarvitan

una grande
innovazione
nella farmacologia
veterinaria:

il primo farmaco per la gestione dell'obesità e sovrappeso del cane

- Risultati rapidi e visibili: nei soggetti trattati si ottiene una perdita di peso del 7% (val. medio) in sole 8 settimane.
- Doppia azione: blocco dei lipidi negli enterociti associato a senso di sazietà senza agire a livello del SNC.
- Posologia e protocollo semplici: facile per il proprietario e per il veterinario.



JANSSEN
ANIMAL HEALTH

www.janssenanimalhealth.com