

LA MALATTIA DI VON WILLEBRAND. II. CASISTICA PERSONALE NEL CANE ALLEVATO IN ITALIA

THE VON WILLEBRAND DISEASE. II. PERSONAL EXPERIENCE IN THE DOG BRED IN ITALY

ALESSANDRA GAVAZZA¹, GEORGE LUBAS², MARCO CALDIN³,
TOMMASO FURLANELLO⁴, CECILIA TAMBONE⁵

¹Medico Veterinario, Dottore di Ricerca, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa

²Professore Associato di 'Clinica Medica Veterinaria', Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa,
Diplomato 'European College Veterinary Internal Medicine, Companion Animals - Internal Medicine'

³Medico Veterinario, Direttore Clinica Veterinaria Privata "San Marco", Padova

⁴Medico Veterinario, Direttore Laboratorio "San Marco", Padova

⁵Biologo, Agrolabo spa, Romano Canavese, Torino

Riassunto

In questa seconda nota sulla malattia di von Willebrand (vWD), sono riportati i risultati di uno studio condotto nell'arco di 7 anni, che ha raccolto i casi spontanei di coagulopatia in cani di razza, sesso ed età diversi. A questi soggetti, pervenuti direttamente o per consulto ai centri partecipanti all'indagine, è stata dosata la quantità del FvW antigene (FvW:Ag) mediante due differenti test ELISA. Una di queste metodiche (FvW-Zymtec[®]) è già stata ampiamente validata per l'impiego nella specie canina. L'altro test (Asserachrom vWF[®]) ha subito la procedura di validazione in questo lavoro, risultando parimenti idoneo per l'impiego nella specie canina (precisione media intrasaggio 2,51%, intersaggio 1,29%; linearità media con regressione lineare di 0,982 e con regressione polinomiale di 0,999, accuratezza con regressione lineare 0,956). Sono stati considerati 157 cani di razze diverse (tra cui 50 Dobermann) che sono stati classificati in base alle risultanze derivanti da un profilo coagulativo comprendente il conteggio delle piastrine, il Tempo di Protrombina ed il Tempo di Tromboplastina Parziale attivato, oltre al dosaggio del FvW:Ag.

È risultato che il 18,5% dei soggetti esaminati era affetto da vWD, mentre il 16,6% era eterozigote per il gene vWD oppure apparentemente sano (purtroppo non era possibile stabilire con esattezza la condizione genetica in questo gruppo di 'incerti') ed infine il 64,9% era esente da vWD. Nell'ambito della razza Dobermann, la percentuale di soggetti sicuramente affetti saliva al 36%, mentre gli 'incerti' (sani o portatori sani) erano il 24% e gli esenti da vWD il 40%. Questi dati sulla prevalenza nel Dobermann sono in accordo con quanto noto in letteratura in altre nazioni. In futuro sarà possibile identificare più correttamente i cd. 'incerti', che appaiono emostaticamente pressoché normali, distinguendoli in veri sani e portatori del gene vWD, grazie alla disponibilità di una tecnologia diagnostica su DNA, che al momento è solo limitata ad alcune razze, tra cui appunto quella del Dobermann.

Summary

In this second paper about von Willebrand disease (vWD), results from the investigations of the past 7 years, concerning collected spontaneous cases of coagulopathy in dogs, differing in breed, sex and age, are reported. These dogs, observed initially or referred to the centers taking part in the survey, were tested for the vWF antigen (vWF:Ag) dosage using two different ELISA kits. The first kit is the FvW-Zymtec[®], which has received wide scale validation for its use in dogs. The other kit is the Asserachrom vWF[®], which has been subjected to validation in this report, providing satisfactory results for the use in canine species (mean precision in both the intra-assay 2.51% and inter-assay 1.29%, mean linearity in both the linear regression .982 and polynomial regression .999, accuracy in linear regression .956). 157 dogs from different breeds (including 50 Dobermanns) have been considered, which were arranged based on the results deriving from a coagulation profile. This profile included the platelet count, the Prothrombin Time, the activated Partial Thromboplastin Time, and obviously the vWF:Ag dosage. Within all subjects that were tested, 18.5% were affected by vWD, whereas 16.6% were heterozygotes for the vWD gene or apparently healthy (indeed it was impossible to establish exactly the genetic status within this group of uncertain animals). Finally, 64.9% of dogs were clear of vWD. In the Dobermann breed, the percentage of true affected animals increased up to 36%, whereas the 'uncertain' category of dogs (healthy or carrier) was 24%, and the dogs clear of vWD were 40%. These data on the Dobermann prevalence are in agreement to what is known in the literature in other countries. In the future, it will be possible to identify the 'uncertain' dogs more correctly, which appear on the coagulation profile as normal, classifying them as true healthy or carrier of vWD gene, thanks to the availability of a DNA molecular technology. This assay, at the moment, is only limited to some breeds, among them, indeed the Dobermann.

INTRODUZIONE

In questa seconda parte dell'articolo che tratta la malattia di von Willebrand (vWD) nel cane sono riportate le indagini eseguite in Italia su questa affezione ereditaria¹. Nel corso di sette anni (periodo 1993-2000) è stata indagata la prevalenza della vWD, impiegando due differenti tecniche ELISA, una già ampiamente validata nell'impiego nel cane, l'altra da validare appropriatamente in questa specie. La vWD è stata già segnalata in Italia, fin dal 1993, in diverse sporadiche segnalazioni²⁻⁷.

Il presente studio non rientrava in un piano concordato con le Associazioni di Razza per l'identificazione della vWD o della distribuzione del difetto genetico. È semplicemente una raccolta della casistica, di soggetti con precedenti anamnestici o con sintomatologia corrente di problemi emorragici od emostatici, che sono afferiti al Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa, o alla Clinica Veterinaria Privata S. Marco di Padova ovvero alla ditta Agrolabo Spa di Romano Canavese (To).

MATERIALI E METODI

In questo studio, sono stati considerati n° 157 cani che presentavano segni clinici pregressi o correnti, soli o combinati tra loro, comprendenti: petecchie sulle mucose, ematomi, epistassi, metrorragia, ematuria, anemia emorragica, sanguinamento anormale da siti chirurgici o traumatici ovvero da semplice prelievo ematico. Per escludere la presenza della vWD in questi soggetti, erano stati riferiti o inizialmente controllati presso uno dei tre centri partecipanti allo studio.

La maggior parte dei cani era stata sottoposta ad una lista più o meno estesa di accertamenti diagnostici di laboratorio tra cui:

- a) emogramma completo;
- b) profilo biochimico, che includeva almeno Aspartato aminotransferasi, Alanina aminotransferasi, Fosfatasi alcalina, Gamma glutamil transpeptidasi, Proteine totali, Albumina, Urea, Creatinina, Bilirubina totale e Colesterolo;
- c) sieroelettroforesi;
- d) test sierologici per *Leishmania infantum* ed *Ehrlichia canis*;
- e) profilo coagulativo che comprendeva almeno la conta delle Piastrine (Plt), il Tempo di protrombina (PT), il Tempo di Tromboplastina parziale attivata (aPTT) e il fibrinogeno; per taluni soggetti è stato eseguito il tempo di sanguinamento alla mucosa buccale (BMBT).

Tutte le analisi di laboratorio di cui sopra erano state eseguite con procedure standard e comunque riportavano valori di intervalli di riferimento appropriati stabiliti da ogni singola struttura, per una corretta interpretazione dei dati.

Le analisi sulla determinazione del fattore di von Willebrand come antigene (FvW:Ag) sono state effettuate su 182 campioni di plasma citrato, ma 25 risultati non sono stati utilizzati per la mancanza totale o parziale dei dati di segnalamento e/o anamnestici. In Tabella 1 sono riportate la suddivisione in razze, la distribuzione nei due sessi e l'età dei soggetti considerati nella presente indagine.

INTRODUCTION

In this paper, the second part of von Willebrand disease (vWD) in the dog, the investigations carried out in Italy about this inherited disorder, are reported¹. During seven years (1993-2000), the prevalence of vWD, using two different ELISA techniques, has been investigated. One method has been already widely validated in the dog, the other one should be validated appropriately in this species. The vWD has been already reported in Italy since 1993 in several occasional reports²⁻⁷.

The current study was not part of an agreement program with the Breeders Associations for the identification of vWD or related to the frequency of this defect. This survey simply collected the cases from animals with history or current symptoms of hemorrhagic or hemostatic disorders. Dogs involved were observed initially or referred to the Veterinary Clinical Department of University of Pisa, or to the S. Marco Private Veterinary Clinic of Padua, and finally to the Agrolabo Spa Company of Romano Canavese (TO).

MATERIALS AND METHODS

In this survey, 157 dogs have been included, which showed current or past clinical signs, combined each other or alone such as: mucosal petechiae, hematomas, epistaxis, metrorrhagia (hemometra), hematuria, hemorrhagic anemia, abnormal bleeding from surgical or traumatic sites or simply from single venipuncture. In order to rule out the vWD occurrence, these subjects have been initially investigated or referred to one of the three centers involved in this study.

Most of these dogs were been already submitted to a short or extended list of laboratory diagnostic procedures including:

- a) complete blood count;
- b) biochemical profile, including at least Aspartate transferase, Alanine transferase, Alkaline phosphatase, Gamma-glutamyl transpeptidase, Total protein, Albumin, BUN, Creatinine, Total Bilirubin, and Cholesterol;
- c) serum electrophoresis;
- d) serological tests for *Leishmania infantum*, and *Ehrlichia canis*;
- e) coagulation profile including at least Platelet (Plt) count, Prothrombin Time (PT), activated Partial Thromboplastin Time (aPTT), and fibrinogen; for some patients the Buccal Mucosal Bleeding Time (BMBT) has been carried out as well.

All the laboratory analysis as listed above, were been performed with standard procedures and included appropriate reference intervals already established by each referring service in order to have a correct interpretation of the data. The assays on von Willebrand factor as antigen (vWF:Ag) have been carried out, indeed, in 182 samples. Results in 25 samples have not been utilized because total or partial history and/or signalment data were lacking. In Table 1 the subdivision by breed,

Per la determinazione quantitativa del FvW:Ag sono stati impiegati campioni di plasma citrato preparati con la seguente procedura: prelievo di sangue venoso, immediato trasferimento del sangue in provette di plastica contenenti come anticoagulante citrato di sodio al 3,8% in rapporto di 1:9, separazione della parte corpuscolata mediante centrifugazione a 1.000 g per 10 minuti, rimozione del plasma mediante pipette di plastica, conservazione del plasma in provette di plastica a temperatura controllata di almeno -5/-10°C fino al momento dell'analisi.

Le due differenti tecniche ELISA impiegate per la determinazione del FvW:Ag sono state:

- FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa, Romano Canavese (TO): metodica correntemente validata nella specie canina secondo Benson et al.⁸; sono stati analizzati n° 111 campioni;
- Asserachrom® vWF, Diagnostica Stago, Boehringer Mannheim, Milano: metodica già impiegata in uno studio sul cane da Arnold et al.⁹ e comparata con una tecnica di riferimento standard impiegata nel cane da Meyer et al.¹⁰; sono stati saggiati n° 66 campioni appartenenti ad un gruppo di cani potenzialmente affetti da vWD e tra questi sono stati identificati 30 soggetti sani che sono stati impiegati per la procedura di validazione del test.

I risultati del dosaggio del FvW:Ag sono espressi in CU/dL (Canine Units su dL), poiché il plasma di controllo e quello dello standard di riferimento sono costituiti da un pool di plasma citrato ottenuto da diversi cani normali. Pertanto, è stata abbandonata l'unità di misura in percentuale (%)¹¹.

La procedura di validazione del test Asserachrom® vWF ha incluso la determinazione di:

- precisione, impiegando tre campioni di plasma citrato canino, rispettivamente con la concentrazione di FvW:Ag di 32 CU/dL (valore basso), 74 e 94 CU/dL (questi ultimi con valore normale); questi campioni sono stati saggiati per 10 volte consecutive per stabilire la precisione intraserie ed è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV), e per 5 giorni consecutivi per valutare la precisione interserie calcolando anche in questo caso il CV;
- linearità, impiegando due campioni di plasma citrato canino, rispettivamente con la concentrazione di FvW:Ag di 69 e 77 CU/dL (valori normali); questi campioni sono stati saggiati non diluiti ed alla diluizione di 1:2, 1:5, 1:10, 1:20 e 1:40 ed i risultati sono stati confrontati con i valori attesi, mediante analisi della regressione lineare e polinomiale (R^2);
- accuratezza, mediante la comparazione dei risultati ottenuti con un test già validato (FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa); a tale scopo n° 16 campioni di plasma citrato canino, di cui 8 con valori bassi patologici e 8 con valori normali, sono stati saggiati con entrambi i test ELISA ed i valori ottenuti sono stati valutati statisticamente con l'analisi della regressione lineare (R^2) ed il 't' di Student.

Infine sono stati stabiliti i limiti dell'intervallo di riferimento mediante il test Asserachrom® vWF, utilizzando n° 30 cani sani.

Per i limiti dell'intervallo di riferimento della normalità del test FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa sono stati impiegati

sex distribution, and animal's age considered in the present study are reported.

The analysis on the vWF:Ag amount has been carried out using citrated plasma samples. Samples were prepared with the following procedure: venous blood collection, transferring of the blood in plastic vials containing sodium citrate at 3.8% as anticoagulant in a rate of 1:9 part of blood, separation from the cellular mass by means of centrifugation at 1,000 G for 10 minutes, collection of the obtained citrated plasma by means of plastic pipettes, storage of citrated plasma in plastic vials in a controlled temperature device of at least -5°C to -10°C, until the analysis were performed.

The two different ELISA techniques used for the vWF:Ag assay were:

- FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa, Romano Canavese (TO), method currently validated in the dog according to Benson et al.⁸; 111 samples have been tested;
- Asserachrom® vWF, Diagnostica Stago, Boehringer Mannheim, Milan; this method was already used in one study in the dog by Arnold et al.⁹, and already compared with a standard reference technique used in dogs by Meyer et al.¹⁰; 66 samples belonging to a group of dogs potentially affected by vWD have been tested; among these samples, 30 healthy dogs were identified, and we used them in the assay validation procedure.

The results of the vWF:Ag amount are reported in CU/dL (Canine Units over dL), because both the control and reference standard plasmas are prepared from citrated plasma obtained from several healthy dogs. Therefore, the percentage unit (%) has been rejected⁵.

The validation procedure of Asserachrom® vWF assay has included the following steps:

- precision, using 3 citrated plasma canine samples, with a vWF:Ag concentration respectively of 32 CU/dL (low value), 74 and 94 CU/dL (both with normal values); these samples have been assayed 10 times consecutively establishing the intra-assay precision and then calculated the coefficient of variation (CV); the same samples have been also tested 5 days consecutively establishing the inter-assay precision and then calculated the CV;
- linearity, using two citrated plasma canine samples, with a vWF:Ag concentration of 69 and 77 CU/dL respectively (normal values); these samples have been tested undiluted and diluted at 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, and 1:40; the results obtained have been compared with the expected values, by means of linear and polynomial regression analysis (R^2);
- accuracy, by comparison of obtained results with those gathered from a previous validated assay (FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa); for such purposes 16 citrated plasma canine samples (8 with pathological low results and 8 with normal values) have been tested with both ELISA assays; results obtained have been evaluated statistically with the linear regression analysis (R^2) and the 't' of Student.

Finally, the appropriate normal reference range has been established by means of Asserachrom® vWF assay, using 30 healthy dogs.

Tabella 1
Distribuzione per razza, sesso ed età dei 157 cani analizzati
per il dosaggio del FvW:Ag

Razza	n. (%)	Sesso	n. (%)
Dobermann	50 (31,9%)	maschi	97 (61,8%)
Pastore tedesco	41 (26,1%)	femmine	60 (38,2%)
meticci	22 (14,0%)	Età	n. (%)
Boxer	8 (5,1%)	fino ad 1 anno	61 (38,8%)
Cocker	6 (3,8%)	da 1 a 2 anni	20 (12,7%)
Alano	3 (1,9%)	da 3 a 4 anni	30 (19,1%)
Bracco Tedesco	3 (1,9%)	da 5 a 6 anni	16 (10,2%)
Labrador	3 (1,9%)	da 7 a 8 anni	15 (9,6%)
altre*	21 (13,4%)	oltre 8 anni	15 (9,6%)

note : n. (%) = numero e percentuale dei soggetti esaminati rispetto al totale (157); * = include : Terranova (2 soggetti analizzati), Airdale Terrier, Barboncino, Bovo Bernese, Corso, Golden Retriever, Irish Wolfhound, Levriero, Manchester Terrier, Pastore Belga, Pastore Maremmano, Pastore Pirenei, Pastore Scozzese, Pinscher, Pointer, Rottweiler, Samoiedo, Siberian Husky, Springer Spaniel, Whippet (tutte con 1 soggetto analizzato).

Tabella 2
Revisione dei criteri per la diagnosi della vWD
(modificata da Dodds et al., 1993¹² e da Brewer, 2000¹³
per i soli cani di razza Dobermann)

FvW:Ag (CU/dL)	BMBT	Classificazione paziente
> 70	normale	soggetto sano
70-79	normale	limite minimo dell'intervallo normale
50-69	normale	valore incerto od eterozigote portatore
31-69	non determinato	valore incerto od eterozigote portatore (Dobermann)
< 50	normale	vWD tipo 1, od eterozigote portatore
< 50	elevato	vWD tipo 1
< 50	normale od elevato	vWD tipo 2
< 30	non determinato	vWD tipo 1 (Dobermann)
< 0,01	elevato	vWD tipo 3
> 180	normale	campione errato o valore influenzato da altre malattie

quelli suggeriti dalla ditta produttrice, ma comunque sono stati ricontrollati in 30 cani risultati avere una quantità normale di FvW:Ag.

I campioni dei 157 soggetti inclusi in questo studio, sono stati classificati in base al risultato della determinazione del FvW:Ag. In pratica, la classificazione dei soggetti analizzati è stata eseguita in accordo alla Tabella 2 ripresa da Dodds et al.¹², modificata da Brewer¹³ per la sola razza Dobermann, e sulla scorta dei dati del profilo emostatico. Queste informazioni hanno permesso di stabilire tre categorie di animali:

- affetti da vWD, con un valore del FvW:Ag al di sotto di 50 CU/dL (30 CU/dL per i cani di razza Dobermann) con BMBT e/o aPTT alterato e/o con sintomi clinici e di laboratorio riferibili ad una patologia dell'emostasi primaria;
- eterozigoti, portatori del gene vWD, sia con un valore di FvW:Ag tra 51-69 CU/dL (31-69 CU/dL per i cani di razza Dobermann) da verificare ulteriormente, che

Table 1
Subdivision by breed, sex and age of 157 dogs tested
for the vWF:Ag amount

Breeds	n. (%)	Sex	n. (%)
Dobermann	50 (31.9%)	male	97 (61.8%)
German Shepherd	41 (26.1%)	female	60 (38.2%)
Mixed	22 (14.0%)	Age	n. (%)
Boxer	8 (5.1%)	up to 1 year	61 (38.8%)
Cocker	6 (3.8%)	from 1 to 2 years	20 (12.7%)
Great Dane	3 (1.9%)	from 3 to 4 years	30 (19.1%)
Kurzhaar	3 (1.9%)	from 5 to 6 years	16 (10.2%)
Labrador	3 (1.9%)	from 7 to 8 years	15 (9.6%)
other *	21 (13.4%)	over 8 years	15 (9.6%)

note : n. (%) = number and percentage of animals tested in relationship to their total number (157); * = include : Newfoundland (2 dogs tested), Airdale Terrier, Poodle, Bernese Mountain dog, Corso, Golden Retriever, Irish Wolfhound, Greyhound, Manchester Terrier, Belgium shepherd, Maremmano shepherd, Great Pyrenees, Collie, Pinscher, Rottweiler, Samoyed, Siberian Husky, Springer Spaniel, Whippet (all these breeds with 1 dog tested).

Table 2
Reviewed criteria for the vWD diagnosis
(reported from Dodds et al., 1993¹², and modified for the Dobermann
dog breed only by Brewer, 2000¹³)

vWF:Ag (CU/dL)	BMBT	Patient classification
above 70	normal	healthy or clear animal
70-79	normal	lower limit of normal range
50-69	normal	equivocal value, or heterozygote carrier
31-69	not determined	equivocal value, or heterozygote carrier (Dobermann)
below 50	normal	vWD type 1, or heterozygote carrier
below 50	prolonged	vWD type 1
below 50	normal or prolonged	vWD type 2
below 30	not determined	vWD type 1 (Dobermann)
below 0.01	prolonged	vWD type 3
above 180	normal	faulty sampling or value influenced by other diseases

For the normal reference ranges of FvW-Zymtec®, Agrolabo Spa, we used those reported by the manufacturer. However, we retested the assay in 30 healthy dogs that they were showing normal values of vWF:Ag.

The samples of the animals included in this study (157) have been subdivided on the basis of the results of vWF:Ag dosage. Practically, the classification of the animals has been performed according to Table 2, reported from Dodds et al.¹², modified by Brewer¹³ for the use in the Dobermann breed only, and from the data collected from hemostatic profile. These information have allowed to establish 3 subsets of animals:

- affected by vWD, with a vWF:Ag value below 50 CU/dL (30 CU/dL for the Dobermann dog breed) with a modified BMBT and/or aPTT and/or with clinical symptoms and laboratory data referred to a primary coagulation disorder;

Tabella 3
Risultati dello studio della precisione intra-saggio ed inter-saggio del test Asserachrom® vWF

Precisione	FvW:Ag = 32 CU/dL	FvW:Ag = 74 CU/dL	FvW:Ag = 94 CU/dL	CV medio (%)
intra-saggio CV (%)	3,52	2,87	1,14	2,51
inter-saggio CV (%)	1,21	1,29	1,38	1,29

con valore di FvW:Ag al di sotto di 50 CU/dL, ma con un BMBT normale e/o senza evidenti segni clinici o dati di laboratorio riferibili ad un disturbo dell'emostasi primaria;

- soggetti sani, esenti da vWD, con un valore di FvW:Ag al di sopra di 70 CU/dL ed ovviamente senza segni di disturbi dell'emostasi.

Nella razza Dobermann è stato scelto l'intervallo tra 31-69 CU/dL per identificare i soggetti eterozigoti portatori del gene vWD, perché a nostro avviso al momento attuale, è il miglior compromesso tra la classificazione di Dodds et al.¹² e quella di Brewer¹³. Quest'ultima inoltre non è stata ufficialmente pubblicata su riviste referenziate, ma appare solo come pagina Web¹⁴.

RISULTATI

Per primi vengono illustrati i risultati della procedura di validazione del test Asserachrom® vWF. La precisione intra-saggio è risultata avere un CV medio di 2,51%, quella inter-saggio un CV medio di 1,29% (Tab. 3).

Impiegando sia lo studio della regressione lineare (R^2) che di quella polinomiale (Figg. 1 e 2), il test Asserachrom® vWF presenta una ottima linearità, rispettivamente di 0,980 e di 0,999 per il campione il cui valore di FvW:Ag è pari a 69 CU/dL e di 0,983 e di 0,999 per il campione il cui valore di FvW:Ag è uguale a 77 CU/dL.

La comparazione dei risultati ottenuti su 16 campioni per la quantificazione del FvW:Ag usando sia il test FvW-Zymtec® che quello Asserachrom® vWF, ha fornito un valore pari a 0,956 nello studio della regressione lineare (R^2) (Fig. 3), mentre il 't' di Student non ha evidenziato differenze significative ($p = n.s.$).

I limiti di riferimento normali, ottenuti impiegando 30 cani sani saggiati con il test Asserachrom® vWF, hanno evidenziato valori tra 73,5-150 CU/dL (media 99,1 CU/dL, deviazione standard ± 20). D'altro lato, il test FvW-Zymtec® presenta valori di riferimento tra 70-164 CU/dL (media 101,7 CU/dL, deviazione standard $\pm 21,8$), per i 60 cani sani saggiati in questa indagine.

Al fine di presentare il numero di analisi eseguite per il dosaggio del FvW:Ag con entrambe le tecniche nel corso degli anni, a partire dalla fine del 1993 fino a tutto il primo semestre del 2000, è stato allestito un istogramma a barre (Fig. 4). È interessante osservare che nel corso degli anni il numero di esami eseguiti è aumentato sensibilmente.

In Tabella 4 sono riportati i dati relativi ai risultati ottenuti dalla determinazione del FvW:Ag, mediante i due test impiegati, che hanno permesso di collocare in tre classi tutti i soggetti esaminati, secondo i gruppi stabiliti nella

Table 3
Results of both intra-assay and inter-assay of the Asserachrom® vWF test

Precision	vWF:Ag = 32 CU/dL	vWF:Ag = 74 CU/dL	vWF:Ag = 94 CU/dL	Mean CV (%)
intra-assay CV (%)	3.52	2.87	1.14	2.51
inter-assay CV (%)	1.21	1.29	1.38	1.29

- heterozygotes, carrier of vWD gene, either animals with a vWF:Ag value between 51-69 CU/dL (31-69 CU/dL for the Dobermann dog breed) to be further assessed, and animals with vWF:Ag below 50 CU/dL, but with a normal BMBT and/or without clinical symptoms or laboratory data referred to a primary coagulation disorder;

- healthy subjects, clear of vWD gene, with a vWF:Ag value above 70 CU/dL and without any sign of coagulation disorder, obviously.

In order to identify heterozygote animals, carrier of vWD gene, and the range between 31-69 CU/dL has been adopted, in the Dobermann breed. To our knowledge, this range represents at the moment the best compromise between the Dodds et al.¹² and Brewer¹³ classification. It should be noted that the Brewer's classification has not been published on referred journals, but it appears only as a web page¹⁴.

RESULTS

As a preliminary work, the results from the validation procedure of the Asserachrom® vWF assay are shown. The intra-assay precision resulted with a mean CV of 2.51%, the inter-assay precision was with a mean CV of 1.29% (Tab. 3).

Using either the linear (R^2) and the polynomial regression analysis (Figg. 1 & 2), Asserachrom® vWF assay shows a very good linearity, respectively of .980 and .999 for the sample where the vWF:Ag value is 69 CU/dL and respectively .983 and .999 for the sample where the vWF:Ag value is 77 CU/dL.

The comparison of the obtained results in 16 samples using either the FvW-Zymtec® and the Asserachrom® vWF assays, has shown a value of .956 in the linear regression analysis (R^2) (Fig. 3), while the 't' of Student did not show any significant difference ($p = n.s.$).

The normal reference ranges, obtained using 30 healthy dogs tested with the Asserachrom® vWF assay, have shown values between 73.5-150 CU/dL (mean 99.1 CU/dL, standard deviation ± 20). On the other side, the FvW-Zymtec® assay shows reference values between 70-164 CU/dL (mean 101.7 CU/dL, standard deviation ± 21.8) in the 60 healthy dogs used in this study.

In order to show the number of tests for the vWF:Ag amount carried out by means of both techniques during the several years, starting from the end of 1993 throughout to the first semester of 2000, a bar histogram has been prepared (Fig. 4). It is possible to no-

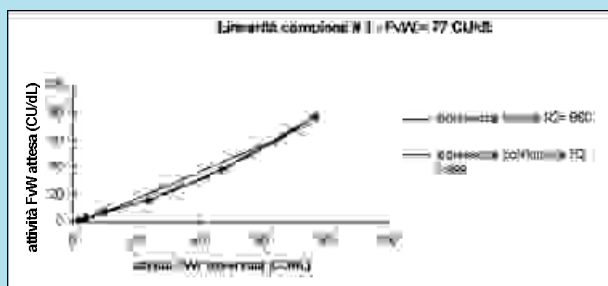


FIGURA 1 - Studio della regressione lineare che di quella polinomiale (R^2) con il test Asserachrom® vWF (campione con quantità di FvW = 77 CU/dL).

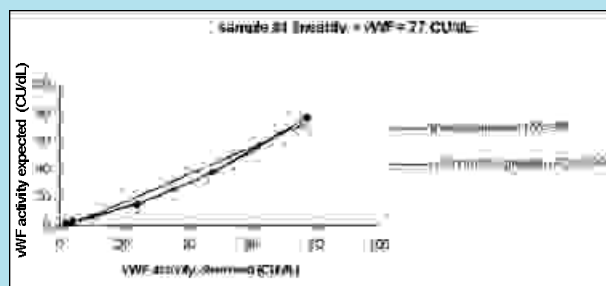


FIGURE 1 - Linear and polynomial regression study (R^2) with the Asserachrom® vWF assay (sample with vWF amount = 77 CU/dL).

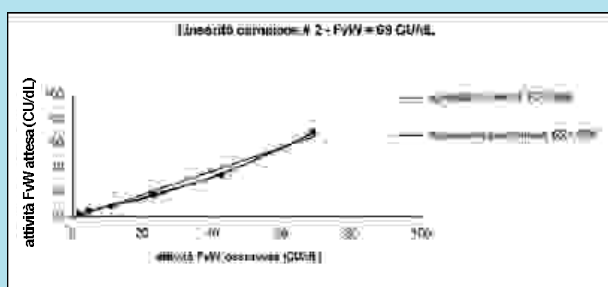


FIGURA 2 - Studio della regressione lineare che di quella polinomiale (R^2) con il test Asserachrom® vWF (campione con quantità di FvW = 69 CU/dL).

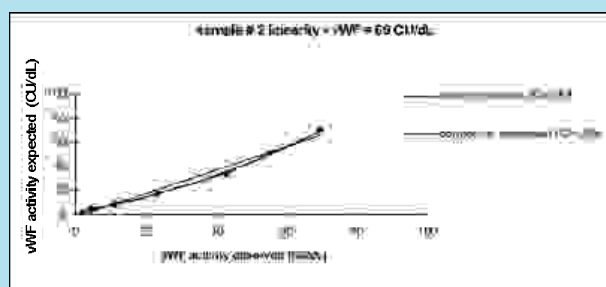


FIGURE 2 - Linear and polynomial regression study (R^2) with the Asserachrom® vWF assay (sample with vWF amount = 69 CU/dL).

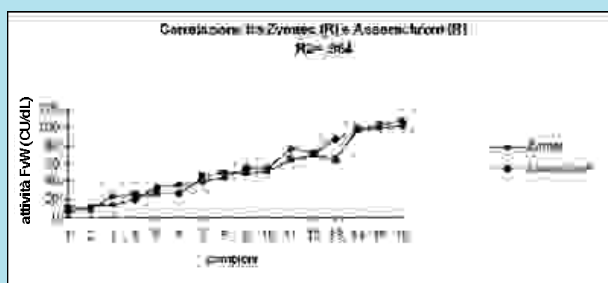


FIGURA 3 - Comparazione mediante lo studio della regressione lineare (R^2) dei risultati ottenuti per il FvW:Ag su 16 campioni usando sia il test FvW-Zymtec® che quello Asserachrom® vWF.

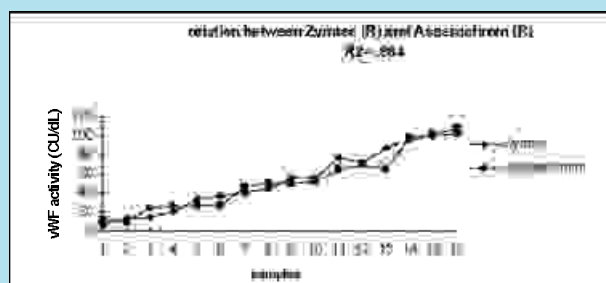


FIGURE 3 - Comparison of the obtained results in 16 samples using both the FvW-Zymtec® and the Asserachrom® vWF assays, in the linear regression study (R^2).

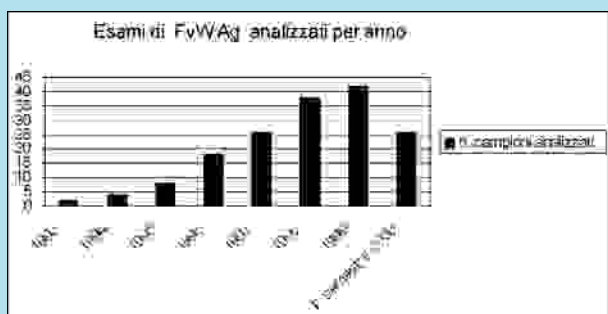


FIGURA 4 - Numero di analisi per il FvW:Ag effettuate con entrambe le tecniche ELISA nel corso degli anni.

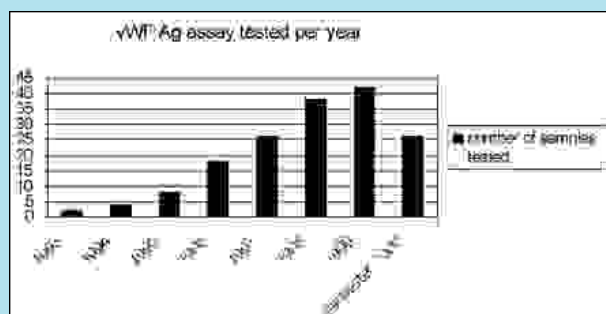


FIGURE 4 - Number of vWF:Ag assays carried out with both ELISA techniques during several years.

Tabella 4
Risultati dello studio classificativo in base al dosaggio del FvW:Ag per tutti i 157 campioni considerati, tra cui 50 soggetti appartenenti alla razza Dobermann e 107 soggetti appartenenti alle altre razze

<i>Intervallo di referenza secondo Dodds et al.¹²</i>	<i>FvW:Ag inf. a 50 CU/dL §</i>	<i>FvW:Ag tra 51-69 CU/dL §</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL §</i>
FvW-Zymtec® (n. 111)	35 (31,5%)	8 (7,2%)	68 (61,3%)
Asserachrom® vWF (n. 59)	13 (19,7%)	15 (22,7%)	38 (57,6%)
tutti i soggetti (n. 157@)	40 (25,6%)	23 (14,9%)	94 (59,5%)
Tutte le razze escluso il Dobermann (n. 74) (FvW-Zymtec®)	11 (14,9%)*	4 (5,4%)**	59 (79,7%)
Tutte le razze escluso il Dobermann (n. 45) (Asserachrom® vWF)	6 (13,2%)#	11 (24,4%)##	29 (64,4%)
Tutti i soggetti escluso quelli di razza Dobermann (n. 107) @@	15 (14,1%)	14 (13,1%)	78 (72,8%)
<i>Intervallo di referenza secondo Brewer¹³, solo razza Dobermann</i>	<i>FvW:Ag inf. a 30 CU/dL §</i>	<i>FvW:Ag tra 31-69 CU/dL §</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL §</i>
FvW-Zymtec® (n. 37)	15 (40,5%)	13 (35,2%)	9 (24,3%)
Asserachrom® vWF (n. 21)	6 (28,6%)	5 (23,8%)	10 (47,6%)
Totali (n. 50) @@@	17 (34,6%)	15 (29,5%)	18 (35,9%)

Note : § = numero (n.) soggetti identificati e loro percentuale (%); @ = 20 soggetti sono stati saggiati con entrambe le tecniche; @@ = 12 soggetti sono stati saggiati con entrambe le tecniche; @@@ = 8 soggetti sono stati saggiati con entrambe le tecniche; * = Irish Wolfhound, Terranova e Kurzaar (1 soggetto), Meticcio (2), Pastore tedesco (6); ** = Pastore tedesco (4); # = Airedale terrier, Cocker, Corso e Meticcio (1), Pastore tedesco (2); ## = Barboncino, Cocker, Boxer, Labrador, Siberian Husky e Whippet (1), Meticcio (3), Pastore tedesco (2); inf.=inferiore; sup.=superiore.

Table 4
Results of the subdivision study based on the vWF:Ag amount considering altogether 157 samples, among them 50 subjects are belonging to the Dobermann breed and 107 subjects are belonging to other breeds

<i>Range according to Dodds et al., 1993¹²</i>	<i>vWF:Ag below 50 CU/dL §</i>	<i>vWF:Ag between 51-69 CU/dL §</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL §</i>
FvW-Zymtec® (n. 111)	35 (31.5%)	8 (7.2%)	68 (61.3%)
Asserachrom® vWF (n. 59)	13 (19.7%)	15 (22.7%)	38 (57.6%)
all subjects (n. 157)@	40 (25.6%)	23 (14.9%)	94 (59.5%)
all breeds, except the Dobermann breed (n. 74) (FvW-Zymtec®)	11 (14.9%)*	4 (5.4%)**	59 (79.7%)
all breeds, except the Dobermann breed (n. 45) (Asserachrom® vWF)	6 (13.2%)#	11 (24.4%)##	29 (64.4%)
all breeds, except the Dobermann breed (n. 107) @@	15 (14.1%)	14 (13.1%)	78 (72.8%)
<i>Range according to Brewer, 2000¹³, Dobermann breed only</i>	<i>vWF:Ag below 30 CU/dL §</i>	<i>vWF:Ag between 31-69 CU/dL §</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL §</i>
FvW-Zymtec® (n. 37)	15 (40.5%)	13 (35.2%)	9 (24.3%)
Asserachrom® vWF (n. 21)	6 (28.6%)	5 (23.8%)	10 (47.6%)
total n. 50 @@@	17 (34.6%)	15 (29.5%)	18 (35.9%)

Note : § = number (n.) of subjects identified and their percentage (%); @ = 20 subjects have been tested with both techniques; @@ = 12 subjects have been tested with both techniques; @@@ = 8 subjects have been tested with both techniques; * = Irish Wolfhound, Newfoundland and Kurzhaar (1 subject), Mixed (2) German Shepherd (6); ** = German Shepherd (4); # = Airedale terrier, Cocker, Corso and Mixed (1), German Shepherd (2); ## = Poodle, Cocker, Boxer, Labrador, Siberian Husky, and Whippet (1), Mixed (3), German Shepherd (2).

precedente sezione, Materiali e Metodi. Considerando tutti i campioni esaminati, si può osservare una quota rilevante di animali sani seguita da quelli con valori di FvW:Ag potenzialmente appartenenti a soggetti malati. Questo andamento è ancora più marcato considerando la sola razza Dobermann, dove la prevalenza di soggetti con ridotti valori di FvW:Ag, al di sotto di 30 CU/dL, sale al 34,6%, contro il 14,1% dei cani appartenenti alle altre razze.

te that during the several years the number of tests carried out has notably increased.

In table 4, the data concerning the results obtained for the vWF:Ag dosage by means of both assays used are reported. These results allowed subdividing in 3 groups all the examined subjects, according to the

Tabella 5
Andamento dell'esame aPTT (normale o alterato) in relazione sia alla quantità di FvW:Ag e sia ai gruppi di razze considerate in questo studio

<i>Intervallo secondo Dodds et al.¹²; tutti i soggetti (n. 157)</i>	<i>n° soggetti con aPTT alterato o normale</i>	<i>FvW:Ag inf. a 50 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag tra 51-69 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL \$</i>
aPTT normale	94 (59,9%)	16 (10,2%)	17 (10,8%)	61 (38,9%)
aPTT alterato	63 (40,1%)	19 (12,1%)	4 (2,5%)	40 (25,5%)
<i>Intervallo secondo Dodds et al.¹²; tutte le razze escluso i Dobermann (n. 107)</i>		<i>FvW:Ag inf. a 50 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag tra 51-69 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL \$</i>
aPTT normale	60 (56,1%)	4 (3,7%)	4 (3,7%)	52 (48,6%)
aPTT alterato	47 (43,9%)	8 (7,5%)	2 (1,9%)	37 (34,6%)
<i>Intervallo secondo Brewer¹³; solo cani Dobermann (n. 50)</i>		<i>FvW:Ag inf. a 30 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag tra 31-69 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL \$</i>
aPTT normale	36 (71,4%)	10 (20,0%)	12 (24,0%)	14 (28,0%)
aPTT alterato	14 (28,6%)	8 (16,0%)	0 (0,0%)	6 (12,0%)

Note: \$ = numero soggetti identificati e loro percentuale (%); inf.=inferiore; sup.=superiore.

Table 5
Behaviour of aPTT test (normal or altered) in relationship either to the vWF:Ag amount and to the group of breeds considered in this study

<i>Range according to Dodds et al., 1993¹²; all subjects (n. 157)</i>	<i>Number of subjects with altered or normal aPTT</i>	<i>vWF:Ag below 50 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag between 51-69 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL \$</i>
normal aPTT	94 (59.9%)	16 (10.2%)	17 (10.8%)	61 (38.9%)
altered aPTT	63 (40.1%)	19 (12.1%)	4 (2.5%)	40 (25.5%)
<i>Range according to Dodds et al., 1993¹²; all breeds except Dobermanns (n. 107)</i>		<i>vWF:Ag below 50 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag between 51-69 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL \$</i>
normal aPTT	60 (56.1%)	4 (3.7%)	4 (3.7%)	52 (48.6%)
altered aPTT	47 (43.9%)	8 (7.5%)	2 (1.9%)	37 (34.6%)
<i>Range according to Brewer, 2000¹³; only Dobermann dogs (n. 50)</i>		<i>vWF:Ag below 30 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag between 31-69 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL \$</i>
normal aPTT	36 (71.4%)	10 (20.0%)	12 (24.0%)	14 (28.0%)
altered aPTT	14 (28.6%)	8 (16.0%)	0 (0.0%)	6 (12.0%)

Note: \$ = number (n.) of subjects identified and their percentage (%).

Tabella 6
Andamento del BMBT (normale o alterato) in relazione alla quantità di FvW:Ag

<i>Solo 14 cani esaminati su 157 totali</i>	<i>n° cani con alterazione o meno del BMBT</i>	<i>FvW:Ag inf. a 50 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag tra 51-69 CU/dL \$</i>	<i>FvW:Ag sup. a 70 CU/dL \$</i>
BMBT normale	6 (42,9%)	1* (7,1%)	0 (0,0%)	5 (35,7%)
BMBT alterato	8 (57,1%)	1* (7,1%)	2** (14,4%)	5 (35,7%)

Note: \$ = numero soggetti identificati e loro percentuale (%); * = 1 solo cane di razza Dobermann con un valore di FvW:Ag inferiore a 30 CU/dL; ** = 2 cani di razza Dobermann con valore di FvW:Ag tra 31-69 CU/dL; inf.=inferiore; sup.=superiore.

Table 6
Behaviour of BMBT (normal or altered) in relationship to the vWF:Ag amount

<i>Only 14 subjects tested over 157 animals</i>	<i>number of subjects with normal or altered BMBT</i>	<i>vWF:Ag below 50 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag between 51-69 CU/dL \$</i>	<i>vWF:Ag above 70 CU/dL \$</i>
normal BMBT	6 (42.9%)	1* (7.1%)	0 (0.0%)	5 (35.7%)
altered BMBT	8 (57.1%)	1* (7.1%)	2** (14.4%)	5 (35.7%)

Note: \$ = number (n.) of subjects identified and their percentage (%); * = only 1 Dobermann breed dog with a vWF:Ag amount below 30 CU/dL; ** = 2 Dobermann breed dog with a vWF:Ag between 31-69 CU/dL.

In tutti i 157 soggetti esaminati sono stati effettuati gli esami del profilo coagulativo, come indicato nella precedente sezione. In Tabella 5, sono stati raccolti i dati ottenuti per l'esame aPTT e confrontati con i risultati della determinazione del FvW:Ag. Purtroppo, il BMBT è stato eseguito soltanto su 14 pazienti (Tab. 6).

In base alla classificazione diagnostica della vWD descritta nella precedente sezione, sono riportati nella Tabella 7 i soggetti risultati sicuramente affetti da vWD, che sono distinti dall'eterogeneo gruppo formato dai soggetti eterozigoti veri e da quelli in cui il dosaggio di FvW:Ag non ha dato riscontri distinti per la vWD (ovvero gli incerti) ed infine i cani sicuramente esenti. Questa classificazione dei 157 cani esaminati è la conseguenza dell'approccio integrato tra i valori ottenuti dagli esami del FvW:Ag, dell'aPTT e del BMBT, come anche della sintomatologia clinica, ove possibile.

CONCLUSIONI

In base alle risultanze ottenute per la procedura di validazione del test Asserachrom® vWF, comprendenti lo studio della precisione (intra ed inter saggio), della linearità e la prova comparativa con un test già validato quale il FvW-Zymtec®, è possibile impiegare utilmente anche questo test per la quantificazione del FvW:Ag nel cane. Inoltre, i limiti nell'intervallo di riferimento di questi due test, nei soggetti sani, sono sostanzialmente sovrapponibili. Ciò risulta in accordo a quanto già stabilito da Arnold et al.⁹ riguardo all'impiego del test Asserachrom® vWF. Tutti gli studiosi che ci hanno preceduto nelle indagini sulla vWD hanno stabilito che l'analisi quantitativa del FvW purtroppo non è da sola in grado di definire con esattezza lo status genetico dei soggetti^{1-7, 11, 12}. Infatti, nell'interpretazione dei dati del vWF:Ag sono sempre da accostare le risultanze del profilo coagulativo ed in particolare del BMBT.

Il numero delle analisi per la determinazione del FvW:Ag è sensibilmente aumentato negli ultimi anni, come è possibile osservare dalla Figura 4, segno di una maggiore sensibilità nei riguardi di questo problema da parte della classe medico veterinaria italiana. In effetti, in quest'ultimo decennio, similmente a quanto avvenuto in altri paesi europei ed extra europei, i medici veterinari hanno preso consapevolezza del problema "malattie ereditarie" nel cane, uno degli aspetti che finora aveva avuto meno attenzione, tra le problematiche che affliggono la specie canina. Secondo un recente articolo di Patterson¹⁵, considerato il "padre" della genetica medica in veterinaria, è ora di finalizzare gli sforzi per risolvere il delicato problema delle affezioni ereditarie vere o sospette negli animali da compagnia. Infatti, non vi sono evidenze di un incremento della frequenza di base delle malattie genetiche, ma si è assistito nell'ultimo decennio al continuo declino nella frequenza delle malattie indotte dall'ambiente, o piuttosto al loro miglior controllo. Di conseguenza, è stato notato un incremento relativo delle malattie in cui i geni giocano un ruolo più determinante. Grazie ai formidabili sviluppi della genetica molecolare, già nell'ultimo decennio, è stato possibile identificare una base genetica certa su un numero significativo di patologie ereditarie nel cane¹⁵.

La presente casistica per il dosaggio del FvW:Ag, raccolta nel corso di diversi anni, ha evidenziato la tendenza ad esaminare un numero piuttosto elevato di cani appartenenti alla razza Dobermann, notoriamente conosciuta co-

groups established in the previous section, Materials and Methods. Considering all the samples tested, a great number of healthy dogs, followed by a number of subjects with vWF:Ag amount potentially belonging to the diseased animals, can be noted. This behaviour is yet more remarkable, considering the Doberman breed only, where the prevalence frequency of subjects with low vWF:Ag values, below 30 CU/dL, increases up to 34.6%, vs. 14.1% of dogs belonging to the other breeds.

Altogether in the 157 subjects tested, the exams of hemostatic profile have been carried out as described in the previous section. In Table 5, the data obtained for the aPTT test are shown and compared with the result of vWF:Ag dosage. Unfortunately, the BMBT has been carried out in only 14 dogs (Tab. 6).

Based on the diagnostic classification of vWD reported in the previous section, the subjects that resulted unequivocally affected by vWD are shown in Table 7. These animals are separated from the heterogeneous group formed by true heterozygote dogs and by those dogs where the vWF:Ag amount did not give any elucidation for vWD (the uncertain dogs) and finally, from the true healthy dogs. This classification of 157 examined dogs is an integrated approach between the obtained values from vWF:Ag, aPTT, and BMBT assays, as well as the clinical symptoms, whenever possible.

CONCLUSIONS

Based on the results obtained from the validation procedure of Asserachrom® vWF assay, including the study on precision (intra and inter assay), linearity, and comparative trial with an already validated assay such as FvW-Zymtec®, it is also useful to adopt this assay for determining the amount of vWF:Ag in dogs. Moreover, the reference ranges of these two assays in healthy animals are practically overlapping each other. These conclusions are in accordance to the investigations of Arnold et al.⁹, regarding the use of the Asserachrom® vWF. All the investigators previously studying the vWD agreed that the quantitative analysis of vWF:Ag alone is not giving the exact idea of the genetic status in the dogs^{1-7, 11, 12}. Therefore, in the vWF:Ag data interpretation should be always evaluated the results of hemostatic profile and particularly with BMBT.

The number of analysis for vWF:Ag assessment significantly increased in the last years, as it can be seen in Figure 4. This is a sign of an increased consciousness toward this problem from the veterinarians in Italy. Actually, in the last decades, as in other European and extra European countries, veterinarians have reached heightened awareness of 'inherited diseases' problem in dogs. This problem has been one of the aspects with less attention, until now, among the problems involving the dog species. According to a recent article by Patterson¹⁵, which is considered the 'father' of medical genetics in veterinary sciences, is just the time to concentrate the maximum efforts to solve the perceptive problem

Tabella 7
Ripartizione dei 157 soggetti esaminati in relazione allo stato di affetto, eterozigote od esente per la vWD

Razze	Numero cani esami-nati	Paziente malato, affetto da vWD *	Soggetto incerto o eterozigote portatore gene per vWD **	Soggetto sano, esente da vWD ***
Dobermann	50	18 (36,0%) §	12 (24,0%) §§	20 (40,0%)
Pastore tedesco	41	5 (12,2%)	7 (17,1%)	29 (70,7%)
Meticci	22	2 (9,1%)	2 (9,1%)	18 (81,8%)
Boxer	8	0 (0,0%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)
Cocker	6	1 (16,7%)	1 (16,7%)	4 (66,6%)
Alano, Labrador	3#	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (100%)
Bracco tedesco	3	1 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (66,7%)
Terranova	2	1 (50,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Airedale terrier	1	1 (100%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Barbone, Irish Wolfhound, Siberian Husky	1#	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0,0%)
Bovaro Bernese, Corso, Golden Retriever, Levriero, Manchester terrier, Pastore belga, Pastore maremmano, Pastore Pirenei, Pastore scozzese, Pinscher, Pointer, Rottweiler, Samoiedo, Springer spaniel, Whippet	1#	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (100%)
Totali	157	29 (18,5%)	26 (16,6%)	102 (64,9%)

Note: * = numero e percentuale di cani appartenenti a tutte le razze considerate nel presente studio, escluso i soggetti di razza Dobermann, con valori di FvW:Ag inferiori a 50 CU/dL, con aPTT e/o BMBT alterato e/o con sintomi clinici manifesti riferibili ad una diatesi emorragica che interessa la fase primaria della coagulazione; ** = numero e percentuale di cani appartenenti a tutte le razze considerate nel presente studio, escluso i soggetti di razza Dobermann, con valori di FvW:Ag tra 51 e 69 CU/dL, con aPTT e/o BMBT normali e senza sintomi clinici riferibili ad una diatesi emorragica che interessa la fase primaria della coagulazione; *** = numero e percentuale di cani appartenenti a tutte le razze considerate nel presente studio, con valori di FvW:Ag superiori a 70 CU/dL, ed ovviamente con aPTT e/o BMBT normali e senza sintomi clinici riferibili ad una diatesi emorragica che interessa la fase primaria della coagulazione; § = numero e percentuale di cani di razza Dobermann, che hanno solo valori di FvW:Ag inferiori a 30 CU/dL o con valori di FvW:Ag inferiori a 50 CU/dL, ma associato con aPTT e/o BMBT alterato e con sintomi clinici riferibili ad una diatesi emorragica che interessa la fase primaria della coagulazione; §§ = numero e percentuale di cani di razza Dobermann, con valori di FvW:Ag tra 31 e 69 CU/dL, con aPTT e/o BMBT normali e senza sintomi clinici riferibili ad una diatesi emorragica che interessa la fase primaria della coagulazione; # = il numero indicato si intende per ciascuna razza elencata.

Table 7
Subdivision of 157 examined dogs in relationship to the likelihood to be affected or being clear from vWD

Breeds	Number of tested animals	Diseased dog, affected by vWD *	Uncertain dog or heterozygote dog vWD carrier **	Healthy dog, clear of vWD ***
Dobermann	50	18 (36.0%) §	12 (24.0%) §§	20 (40.0%)
German Shepherd	41	5 (12.2%)	7 (17.1%)	29 (70.7%)
Mixed	22	2 (9.1%)	2 (9.1%)	18 (81.8%)
Boxer	8	0 (0.0%)	1 (12.5%)	7 (87.5%)
Cocker	6	1 (16.7%)	1 (16.7%)	4 (66.6%)
Great Dane, Labrador	3#	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (100%)
Kurzhaar	3	1 (33.3%)	0 (0.0%)	2 (66.7%)
Newfoundland	2	1 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)
Airedale terrier	1	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Poodle, Irish Wolfhound, Siberian Husky	1#	0 (0.0%)	1 (100%)	0 (0.0%)
Bernese mountain dog, Corso, Golden Retriever, Greyhound, Manchester terrier, Belgium shepherd, Maremmano shepherd, Great Pyrenees, Collie, Pinscher, Pointer, Rottweiler, Samoyed, Springer spaniel, Whippet	1#	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (100%)
Total	157	29 (18.5%)	26 (16.6%)	102 (64.9%)

Note: * = number and percentage of dogs belonging to all breed considered in this study, except the Dobermann breed dogs, having vWF:Ag values below 50 CU/dL, with altered aPTT and/or BMBT and/or showing clinical symptoms referred to a coagulation disorder involving the primary phase of hemostasis; ** = number and percentage of dogs belonging to all breed considered in this study, except the Dobermann breed dogs, with vWF:Ag values between 51 and 69 CU/dL, with normal aPTT and/or BMBT and without clinical symptoms referred to a coagulation disorder involving the primary phase of hemostasis; *** = number and percentage of dogs belonging to all breed considered in this study, having vWF:Ag values above 70 CU/dL, and obviously with normal aPTT and/or BMBT, and without clinical symptoms referred to a coagulation disorder involving the primary phase of hemostasis; § = number and percentage of Dobermann breed dogs, having only vWF:Ag values below 30 CU/dL or vWF:Ag values below 50 CU/dL, but associated with altered aPTT and/or BMBT and with clinical symptoms referred to a coagulation disorder involving the primary phase of hemostasis; §§ = number and percentage of Dobermann breed dogs, with vWF:Ag values between 31 and 69 CU/dL, with normal aPTT and BMBT and without clinical symptoms referred to a coagulation disorder involving the primary phase of hemostasis; # = the number indicated is referred for each listed breed.

me una razza a rischio per la vWD (Tab. 1). In seconda posizione, come razza con un elevato numero di soggetti esaminati è collocato il Pastore tedesco; vi è anche un consistente numero di soggetti meticcii, che segnala la tendenza, da parte dei medici veterinari, a ricercare la vWD anche in questo eterogeneo gruppo di cani. Ciò, si è poi tradotto (Tab. 7) nel rilievo di ben 2 su 22 soggetti meticcii affetti da vWD, con dati percentuali pressoché simili al Pastore tedesco. Per le altre razze, non è possibile trarre alcuna conclusione circa l'effettiva consistenza del problema vWD, a causa dell'esiguo numero di soggetti considerati.

Per quanto riguarda la suddivisione tra i sessi nei 157 cani della casistica, è da annotare la maggior tendenza ad esaminare più soggetti maschi, quasi a voler confermare una buona regola in riproduzione, cioè quella di verificare l'integrità genetica dello stallone, il principale responsabile della diffusione dei problemi legati all'eredità. Infine, per quanto concerne la distribuzione degli accertamenti per il FvW:Ag in rapporto all'età degli animali, ovviamente un elevato numero comprende la classe di soggetti fino ad 1 anno di età (38,8%) (da un minimo di 3 mesi fino ai 12 mesi). Piuttosto elevato è anche il numero di soggetti esaminati con età superiore ad 8 anni (9,6%), come anche di quelli tra 5-6 e 7-8 anni di età (valori simili). Ciò è in evidente contrasto con la filosofia eugenetica, che prevede di testare i giovani animali, prima che vengano utilizzati nella riproduzione. In effetti, questo è il primo studio che è stato organizzato in maniera sistematica in Italia e l'esecuzione delle analisi è stata eseguita indipendentemente dal fattore età. Infatti, data la notevole variabilità dei sintomi clinici della vWD, essi potrebbero emergere anche ad età più avanzata.

Inoltre, questa indagine è stata intrapresa su una popolazione di cani che aveva manifestato sintomi clinici di coagulopatia, ma in futuro è auspicabile che venga saggiato un numero più elevato di giovani animali, anche al solo scopo preventivo di poter disporre per la riproduzione, di soggetti sicuramente esenti da vWD. Nel caso invece, si intendesse ridurre più rapidamente la frequenza dei portatori di vWD, è necessario ricorrere al test con tecnologia DNA, almeno per quelle razze ove è disponibile, poiché la determinazione del solo FvW:Ag, anche se unito ad altri esami diagnostici sulla coagulazione, è insufficiente per classificare i soggetti dal punto di vista genetico.

Nelle Tabelle 4, 5 e 6 sono stati riportati i risultati rispettivamente degli esami del FvW:Ag, dell'aPTT e ove possibile del BMBT. Nella preparazione delle Tabelle 4 e 5 è stata prestata una particolare attenzione al cane di razza Dobermann, che, come è stato già stabilito, ha valori interpretativi di FvW:Ag leggermente differenti dalle altre razze. Comunque, tra i dati più significativi riportati in queste tabelle, vi è la prevalenza, più che raddoppiata, dei soggetti appartenenti alla razza Dobermann con valori di FvW:Ag inferiore a 30 CU/dL, rispetto ai soggetti facenti parte di tutte le altre razze, ma con valori di FvW:Ag inferiori a 50 CU/dL.

In dettaglio, nella Tabella 4, la prevalenza, in tutta la casistica esaminata (157 animali), di soggetti con valori di FvW:Ag inferiori a 50 CU/dL è piuttosto elevata, pari circa ad un quarto della popolazione. Con l'impiego del test FvW-Zymtec® è stato rilevato un numero più elevato di soggetti con FvW:Ag al di sotto di 50 CU/dL, rispetto a quello rilevato nei soggetti saggiati con il test Asserachrom vWF®. Questo risultato, è probabilmente imputabile al tipo di popolazione saggiato con i due test (campioni da casi spontanei di coagulopatia invece di campioni sufficientemente randomizzati). Esaminando in

of hereditary disease (true or suspected) in pet animals. Indeed, there are little evidences of an increase on the basic frequency of genetic diseases. In the last decades, a constant decrease in the frequency of diseases induced by environment, has been observed or conversely an increased awareness regarding their control. Consequently, a relative increase of diseases where the genes play a more significant role has been noted. Thanks to the amazing progress on molecular genetics, in the last decades, the identification of a true genetic basis on a significant number of dogs' inherited disease has been possible¹⁵.

The cases here reported with the vWF:Ag estimation, collected over several years, gives evidence to the tendency to examine, a rather high number of dogs belonging to the Dobermann breed, commonly known as a breed to be at risk for vWD (Tab. 1). In second position the German Shepherd is listed, as a breed with a high number of tested animals. There is also a notably number of mixed bred dogs that suggests the tendency to search dogs affected by vWD in this heterogeneous group of animals too. Consequently, this notation provides the results (Tab. 7) of 2 mixed bred dogs affected by vWD, over 22 dogs examined, with percentage data rather similar to the German Shepherd. For the other breeds, any conclusion about the effective dimension of vWD problem is not possible to achieve, because of the reduced number of subjects considered.

Considering the subdivision between sex in the 157 dogs here reported, there is a tendency to test more male animals. This finding, confirms a golden rule in reproduction, namely to verify the genetic integrity of the stallion, the main responsible to spread problems linked to heredity issues. Finally, concerning the distribution of the vWF:Ag estimation in relationship to the animal's age, obviously a high number belongs to the group of subjects up to 1 year old (38.8%) (from a minimum of 3 months up to 12 months). The number of subjects with an age above 8 years (9.6%) is also rather high, as well as those grouped with an age of 5-6 and 7-8 year old (similar figures). These data are in disagreement with an eugenetic philosophy, namely to assay young animals before they are used for reproduction. Really, this study is the first one that has been organized systematically in Italy. The analysis has been carried out unrelated to the animal's age. Indeed, the extreme variability of the vWD clinical symptoms has been considered, because they could occur also at older age.

Moreover, this study has been carried out in a population of dogs that had displayed clinical evidence of a coagulopathy. In the future, the estimation of vWF:Ag should involve a higher number of young animals, even for a preventive purpose, in order to achieve dogs clear of vWD to be used for reproduction. On the contrary, in case we would like to reduce rapidly the vWD carrier frequency, the use of a molecular genetic testing should be advisable, at least for those breeds where this test is available. Indeed, the vWF:Ag dosage only, even if coupled with other diagnostic assays on coagulation, is inadequate to classify the subjects according to their genetic status.

successione i dati riportati in Tabella 4, relativi al gruppo di soggetti appartenenti a tutte le razze escluso il Dobermann, è pressoché simile il numero di soggetti identificati con valori di FvW:Ag inferiori a 50 CU/dL con i due test, mentre è completamente differente nel gruppo che hanno valori di FvW:Ag tra 51-69 CU/dL. Nel gruppo dei soli Dobermann, il numero di soggetti identificati con valori di FvW:Ag inferiore a 30 CU/dL, come anche quello con valori di FvW:Ag tra 31-69 CU/dL è più elevato con il test FvW-Zymtec®. In conclusione, se si fosse utilizzato un intervallo più ampio per collocare come malati di vWD i cani di razza Dobermann, questi sarebbero stati ancora più numerosi.

Nella Tabella 5 sono riportati i risultati del test aPTT in relazione al dosaggio del FvW:Ag. L'aPTT è di scarso significato se preso singolarmente, poiché un suo allungamento è indice di un'alterazione della fase intrinseca della coagulazione, e deve essere interpretato almeno insieme al PT, che valuta la fase estrinseca. Seppure con queste limitazioni, nel totale dei 157 cani esaminati in questo studio (Tab. 5), la sensibilità clinica dell'aPTT nel rilevare una vWD è pari al 30,1% (19/63), mentre la specificità clinica è del 83% {(94-16)/94}. Nel gruppo comprendente le diverse razze, escluso la razza Dobermann, la sensibilità scende al 17%, mentre la specificità sale al 93,3%. Nella sola razza Dobermann la sensibilità si attesta al 66,7% mentre la specificità è pari al 72,2%.

Scarsi commenti sono possibili per la relazione tra il BMBT ed il test del FvW:Ag, a causa dell'esiguo numero di soggetti esaminati con entrambi i test, ma comunque i dati rilevati sono riportati in Tabella 6. Risulta ormai noto che il BMBT sia preliminare alla valutazione dello stato di vWD ed è anche il test che fornisce la migliore interpretazione dei valori del FvW¹.

Infine, nella Tabella 7 sono riportati i dati conclusivi circa la prevalenza della vWD nei cani esaminati nel presente studio. Questi dati sono scaturiti dall'integrazione delle informazioni derivanti dal segnalamento, anamnesi, situazione clinica, esami di laboratorio del profilo coagulativo (numero di Plt, valori di PT, aPTT e Fibrinogeno) ed infine dosaggio del FvW:Ag, che hanno permesso di stabilire l'esatta entità dei soggetti affetti da vWD. Occorre rimarcare che nella razza Dobermann è stato impiegato per i cani affetti da vWD, come già ricordato, un apposito e differente intervallo di FvW:Ag da quello usato nei soggetti di altre razze. Un importante rilievo è l'elevata prevalenza di soggetti affetti da vWD nel cane di razza Dobermann, cioè il 36% (0,36). Applicando la legge di Hardy-Weinberg, che permette di calcolare la frequenza genica del gene vWD, tramite il metodo della radice quadrata applicato alla frequenza osservata dei soggetti affetti da vWD, si ottengono per il Dobermann e per il Pastore tedesco, i valori del gene mutato che sono pari rispettivamente a 0,60 ($\sqrt{0,36}$) e 0,349 ($\sqrt{0,122}$). Quindi, applicando la medesima legge, si ricava la frequenza del gene sano, tramite una semplice operazione di sottrazione, cioè 1,0 meno il valore della frequenza genica del gene mutato. Si ottengono pertanto per il Dobermann e per il Pastore tedesco rispettivamente valori di 0,40 (40%) di 0,651 (65,1%). Invece, il calcolo delle frequenze fenotipiche attese per il Dobermann è: malati di vWD 0,36 (36%), eterozigoti 0,48 (48%), sani 0,16 (16%). D'altro lato, il calcolo delle frequenze fenotipiche attese per il Pastore tedesco risulta: malati vWD 0,122 (12,2%), eterozigoti 0,454 (45,4%), sani 0,424

In Tables 4, 5, and 6, the results obtained for vWF:Ag, aPTT, and whenever possible BMBT respectively have been reported. In the preparation of Tables 4 and 5, a particular attention has been used for the Dobermann breed dog, which has interpretative values of vWF:Ag slightly different from the other breeds, as already pointed out. However, among the most significant data shown in these tables, there is a prevalence, more than doubled, of subjects belonging to the Dobermann breed which have vWF:Ag values below 30 CU/dL, in comparison to the subjects belonging to all other breeds, which have vWF:Ag values below 50 CU/dL.

In Table 4 particularly, in all cases considered (157 animals), the prevalence of subjects with vWF:Ag values below 50 CU/dL is rather high, approximately a quarter of the population. Using the FvW-Zymtec® assay more subjects with FvW:Ag below 50 CU/dL has been detected, than those detected with the Asserachrom vWF® assay. This result is probably due to the type of population tested with the two assays (samples collected from cases of spontaneous coagulopathy instead of randomized samples). In the examination of the data further reported in Table 4, concerning the group of subjects belonging to all breeds except the Dobermann, the number of animals identified having vWF:Ag values below 50 CU/dL with both assays is very similar. On the contrary, the number of animals identified having vWF:Ag values between 51-69 CU/dL with both assays is completely different. In the group of the Dobermann only, the number of subjects having vWF:Ag values below 30 CU/dL, as well as those with vWF:Ag values between 31-69 CU/dL is higher using the FvW-Zymtec® assay. In conclusion, if we were using a wider reference range for classifying the Dobermann breed dogs as diseased, the animals affected by vWD would be more numerous than here reported.

In Table 5, the results of aPTT assay in relationship to the vWF:Ag assay are reported. The aPTT test has poor significance if considered alone. Indeed, a prolonged aPTT is indicating an alteration of intrinsic pathway, but should be interpreted at least with the PT test, which is evaluating the extrinsic pathway. In 157 dogs here considered, the clinical sensitivity of aPTT toward vWD is 30.1% (19/63), while the clinical specificity is 83% {(94-16)/94}. In the group including several breeds, except the Dobermann breed, the sensitivity declines to 17%, while the specificity rises up to 93.3%. In the Dobermann dog breed the sensitivity is set to 66.7%, while the specificity is 72.2%.

Very few comments between BMBT and vWF:Ag assay relationship are possible, because of the reduced number of tested animals who received both tests. Complete data are shown in Table 6. It is well known that the BMBT test is preliminary to vWD assessment. It is the best assay that can be used to have the correct interpretation of vWF:Ag values¹.

Finally, Table 7 displays final data regarding the vWD prevalence in the dogs considered in this study. These data are derived from the integrated information deriving from the signalment, history, clinical situation, laboratory exams of the coagulation profile (Plt count,

(42,4%). Ciò, è in contrasto con quanto è rilevato dalla tabella 9, dove nel Dobermann esiste una netta differenza, con un eccesso di soggetti malati rispetto ai soggetti sani, mentre nel Pastore tedesco avviene il contrario. Queste differenze rimarchevoli possono essere spiegate solo con la constatazione che, le popolazioni considerate nell'indagine, non erano state sufficientemente randomizzate e, pertanto, non potevano seguire la legge di Hardy-Weinberg (basta anche considerare la semplice distribuzione nei sessi, che non è uniforme). Pertanto, ulteriori indagini con popolazioni randomizzate, sarebbero auspicabili e saranno possibili solo con la disponibilità delle Società Cinofile Specializzate, alcune delle quali sono già da tempo impegnate in altri settori di profilassi eugenetica quali ad es. l'accertamento della displasia dell'anca. Particolare attenzione dovrà essere posta ai cani di razza Dobermann, dove è disponibile un test brevettato con tecnologia su DNA, che può permettere di eradicare quasi completamente la vWD grazie al riconoscimento dei soggetti portatori. Questa analisi, seppure abbia tuttora un costo piuttosto elevato, è effettuabile con un semplice tampone del cavo orale per raccogliere una piccola quantità di cellule epiteliali, sufficienti per questo accertamento¹⁶.

Ringraziamenti

Al Prof. E. Righi ematologo INFN, Frascati, Roma, per la attenta rilettura del manoscritto e per i preziosi suggerimenti. A tutti i medici veterinari che hanno riferito la maggior parte della casistica, ai tre centri coinvolti nell'indagine e che si devono sentire parte effettiva del presente lavoro.

Bibliografia

1. Lubas G., Gavazza A., Caldin M., Furlanello T., Tambone C. - La Malattia di von Willebrand nel cane. I. Recenti acquisizioni diagnostiche. Veterinaria, 16: 1-8, 2002.
2. Righi E. : Emofilia A e malattia di von Willebrand: annotazione di genetica e di ematologia comparata - Atti "Tecnologie Avanzate di Diagnostica, Terapia Oncologica e Anomalie Genetiche", Serie Simposi ENEA, 157-236, 1985.
3. Stefanon G, Stefanon B, Stefanon G, et al. : Inherited and acquired canine bleeding disorders in Northeastern Italy. Can Pract, 18: 15-22, 1993.
4. Stefanon G, Stefanon B, Stefanon G, et al. : Diagnosi di laboratorio delle coagulopatie ereditarie del cane. Obiett & Doc Vet, 2: 45-48, 1993.
5. Gavazza A, Lubas G : Coagulopatie ereditarie nel cane: la malattia di von Willebrand e l'emofilia A. Cinologia, 3: 21-26, 1995.
6. Lubas G, Marchetti V, Tambone, et al. : La malattia di von Willebrand nel cane: indagini preliminari nella razza Dobermann allevata in Italia. Cinologia 1: 41-47, 1997.
7. Lubas G, Gavazza A, Caldin M, et al. : Survey on the prevalence of canine von Willebrand's disease in Italy. Jour Vet Int Med, 14, 234, 2000.
8. Benson RE, Catalfamo JL, Dodds WJ : A Multispecies Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for von Willebrand's Factor. J Lab Clin Med, 119: 420-427.
9. 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.
10. Meyer KM, Wardrop KJ, Helmick C, et al. : von Willebrand factor is present in the vascular endothelium from normal dogs and from Dobermann pinscher dogs with a plasma von Willebrand factor deficiency. Thromb Res, 57, 109-116, 1990.
11. De Goegeui RR, Feldman BF : von Willebrand's Disease. Comp Haem Intl, 7: 187-196, 1997.
12. Dodds WJ, Raymond SL, Brooks M : Inherited and Acquired von Willebrand's Disease, Part 1. Vet Pract Staff, 5: 13-17, 1993.
13. Brewer GJ : DNA Studies in Dobermann von Willebrand's Disease. WWW.vetgen.com, 1-4, 2000.
14. WWW.geneseach.net : home page
15. Patterson DF : Companion Animal Medicine in the Age of Medical Genetics. J Vet Int Med, 14: 1-9, 2000.
16. WWW.vetgen.com - Dobermann vWD Disease Statistics, 1-2, 2000.

PT, aPTT, and Fibrinogen values), and finally the vWF:Ag amount. This integrated approach allowed establishing the exact number of subjects affected by vWD. It should be noted, we used in the Dobermann breed dogs, a pre-set range of vWF:Ag different from the other breeds, to categorize the affected dogs. Another remarked element, the high prevalence of subjects affected by vWF in the Dobermann breed dog should be pointed out, namely the 36% ($\sqrt{0.36}$). Using the Hardy-Weinberg law, is possible to obtain for Dobermann and German Shepherd, the values of the mutated gene which is equal respectively to 0.60 (± 0.36) and 0.349 ($\sqrt{0.122}$). Indeed, this law allows calculating the gene frequency of vWD gene, by means of the square root method applied to the observed frequency in the subjects affected by vWD. Then, applying again the same law, the clear gene frequency can be achieved, by means of a simple subtraction, namely 1.0 minus the value of the mutated gene frequency. Therefore, values of 0.40 (40%) and 0.651 (65.1%) can be obtained for Dobermann and German Shepherd respectively. On the contrary, the calculations of the expected phenotypic frequencies in the Dobermann are: affected by vWD 0.36 (36%), heterozygotes 0.48 (48%), healthy 0.16 (16%). On the other hand, the calculations of the expected phenotypic frequencies for the German Shepherd are: affected by vWD 0.122 (12.2%), heterozygotes 0.454 (45.4%), healthy 0.424 (42.4%). These results are in contrast to what is reported in Table 9, where in the Dobermann exists an unequivocal difference, with an excess of diseased dogs in comparison to clear animals, while in the German Shepherd is occurring the contrary. These remarkable differences can be explained only by taking note that the populations considered in this study were not been adequately randomized. Therefore, the Hardy-Weinberg law could not be followed (take a look simply to the sex distribution, which is uneven). Hence, further investigations with randomized population, would be very important, and they will be suitable only with the co-operation of the several Canine Breeders Association. Some Associations are already currently engaged in other genetic preventive programs, such as i.e. hip dysplasia control. Special notes should be made in the Dobermann breed dogs, where a patented assay, using molecular DNA technology is available, that can allow almost complete control of vWD, thanks to the carrier identification. This assay, is quite expensive at the moment, but can be carried out by a simple oral cavity swab in order to collect few epithelial cells enough for the analytical procedure¹⁶.

Acknowledgements

To Prof. E. Righi, INFN hematologist, Frascati, Rome, for careful reading the manuscript and for the invaluable advices given. To all practitioners, veterinarians, who referred the large number of the cases here reported to the 3 centers involved in this study. Thanks to all for taking an active part in this study.