



Verslag

Frequentiebepaling via DNA-testen van een aantal
prioritaire erfelijke aandoeningen bij een aantal
hondenrassen

Prof. Luc Peelman

Email: Luc.Peelman@UGent.be

Dr. Mario Van Poucke

Email: Mario.VanPoucke@UGent.be

Met steun van de
Vlaamse overheid 

Departement Landbouw en Visserij
Afdeling Duurzame Landbouwontwikkeling | Team Kwaliteit en Innovatie
Koning Albert II-laan 35 bus 40 | 1030 Brussel

Situering

Om een geïntegreerde fokstrategie voor de verschillende hondenrassen in België te kunnen uitwerken op een verantwoorde en wetenschappelijk onderbouwde manier dienen per ras twee belangrijke aspecten binnen de Belgische context te worden onderzocht. Enerzijds dient nagegaan te worden wat de genetische diversiteit en inteeltgraad is binnen de rassen en anderzijds dient bepaald te worden wat de frequentie is van de belangrijkste erfelijke aandoeningen in deze rassen. Enkel door deze gegevens te combineren kan een degelijke geïntegreerde fokstrategie in de huidige Belgische context uitgewerkt worden. Tot op heden werd voor het bepalen van de frequentie van erfelijke aandoeningen gebruik gemaakt van gegevens verzameld in buitenlandse studies/populaties, voor zover die er al zijn/waren. Deze gegevens werden geëxtrapoleerd naar de Belgische situatie. Hoewel dit zeker een indicatie kan geven over de lokale toestand, houdt het ook een aantal mogelijke valstrikken in. Genetische diversiteit en ook de frequentie van erfelijke aandoeningen zijn onderhevig aan plaats- en tijdsgebonden schommelingen als gevolg van het (overmatig) inzetten van bepaalde (populaire) dieren waardoor subpopulaties (lijnen) ontstaan die wat betreft genetische samenstelling behoorlijk van elkaar kunnen verschillen en die bijgevolg niet representatief zijn voor elkaar.

Om een goed idee te krijgen over de Belgische situatie dienen beide aspecten in de huidige, lokale context bepaald te worden. Het geeft weinig meerwaarde om enkel de genetische diversiteit binnen de Belgische populaties te bepalen en voor de erfelijke afwijkingen van buitenlandse gegevens gebruik te maken of omgekeerd. Om echt een goed werkinstrument te maken dienen beide zaken op dezelfde populaties bepaald te worden. Aangezien er nauwelijks tot geen frequentiebepalingen van erfelijke aandoeningen binnen in België gehouden hondenrassen werden uitgevoerd dient dit nog te gebeuren. Gegevens over frequenties van erfelijke aandoeningen verkregen via dierenartsen, dierenklinieken en fokkers zijn heel fragmentarisch om verschillende redenen, waarvan de voornaamste uiteraard is dat er op enkele uitzonderingen na geen systematische registratie is. In veel gevallen worden dierenartsen en dierenklinieken enkel geconfronteerd met aangetaste dieren of dieren waarvan een vermoeden van aantasting bestaat. Een bijkomend probleem is dat nogal wat erfelijke aandoeningen sterk gelijkende symptomen veroorzaken en dat de symptomen van dezelfde aandoening sterke variaties kunnen vertonen waardoor een eenduidige diagnose moeilijk is en de frequentie van voorkomen van de aandoeningen moeilijk te bepalen is op basis van uiterlijke kenmerken. Frequentieschattingen louter op basis van klinische aspecten dienen dan ook met de nodige voorzichtigheid genomen te worden. De situatie is heel anders voor de erfelijke aandoeningen waarvoor een DNA-test werd ontwikkeld. Frequentiebepalingen van mutaties verantwoordelijk voor een erfelijke aandoening kunnen veel betrouwbaarder gebeuren. Een niet onbelangrijk pluspunt hierbij is dat voor recessieve aandoeningen ook binnen de groep van niet aangetaste dieren onderscheid gemaakt kan worden tussen heterozygoten (dragers), die de mutatie aan 50% van de nakomelingen doorgeven, en homozygoten die volledig vrij zijn van de mutatie. Bij de frequentiebepaling op basis van een DNA-test kan dus ook de frequentie bepaald worden van asymptomatische dragers, wat een belangrijk aspect is om gedegen fokadvies te kunnen geven.

Met de resultaten bekomen in dit project hopen we een eerste aanzet te geven tot het hierboven beschreven opzet.

Keuze van de te bestuderen rassen

Tien rassen werden uitgekozen. De keuze was enerzijds gebaseerd op de rassen opgenomen in de initiële studie uitgevoerd door de groep van prof. Nadine Buys (KULeuven) in het kader van het Consortium. Dit om, zoals hierboven aangegeven, de data van beide onderzoeken zoveel mogelijk te kunnen integreren. Het betreft de rassen border collie, Duitse herder, golden retriever en labrador retriever. Voor zes rassen betrokken in de vermelde studie, Ardense koehond, Vlaamse koehond, Mechelse herder, Tervuurse herder, Belgisch griffonnetje en Brussels griffonnetje, waren geen specifieke DNA testen in het openbare domein beschikbaar. De Mechelse herder werd echter wel opgenomen in de studie. Gezien de populariteit van het ras in België en de relatieve verwantschap met de Duitse herder vonden we het interessant en nuttig om na te gaan in hoeverre de bij de Duitse herder geïdentificeerde mutaties ook aanwezig zijn bij de Mechelse herder. Hoewel veel erfelijke aandoeningen bij honden ras specifiek zijn worden een aantal aangetroffen bij heel wat rassen. Dikwijls zijn dit oude mutaties die reeds aanwezig waren voor de splitsing van de rassen, soms zijn het nieuwere mutaties die door (onbewuste) inkruising in een ander ras werden geïntroduceerd. Het schipperke, waarvoor 1 DNA test beschikbaar was op het ogenblik van de indiening van het projectvoorstel, is dan weer een weinig populair ras in België en werd daarom niet opgenomen in deze studie.

Naast de 5 vermelde rassen werden nog vijf andere, in België relatief populaire rassen waarvoor minstens 2 DNA testen beschikbaar waren opgenomen in de studie. Het betreft de Australische herder, boxer, cavalier King Charles spaniel, Ierse setter en rottweiler.

Selectie van te typeren dieren

Om een zo representatief mogelijke steekproef van de Belgische (Vlaamse) populatie van elk van de te onderzoeken rassen te verkrijgen werden stalen verzameld via verschillende kanalen zijnde fokverenigingen, individuele fokkers, dierenartsen en dierenklinieken. Gestreefd werd om minimaal 50 dieren van elk ras te verzamelen en zo weinig mogelijk verwante dieren in het onderzoek op te nemen. Enkel voor de Australische herder werd niet aan het minimum van 50 dieren geraakt ($n = 32$). De verwantschap bleek niet altijd te controleren wegens het ontbreken van gegevens voor bepaalde dieren. Door te werken met verschillende kanalen bij het verzamelen van de stalen menen we echter dat het aantal verwante dieren in onze onderzochte populaties klein is en dat de bias die hierdoor wordt gecreëerd beperkt is. Frequentiegegevens moeten sowieso altijd met de nodige omzichtigheid genomen worden en mogen zeker niet als absolute cijfers beschouwd worden. Niettemin zijn we er van overtuigd dat de verkregen resultaten voor alle 10 de onderzochte rassen een goede indicatie geven over de aanwezige genetische belasting met betrekking tot de onderzochte aandoeningen en dat de verkregen gegevens nuttig zijn voor de Belgische hondenfokkerij. Hierna worden bij elk van de onderzochte rassen en aandoeningen de gevonden mutatiefrequenties gegeven en toegelicht. Tevens wordt voor elk ras op basis van de gevonden frequenties en de ernst van de aandoening een fokadvies geformuleerd.

Australische herder

Voor de Australische herder werden 6 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft de aandoeningen collie eye anomalie (CEA), hereditary cataract (HC), hyperuricosuria (HUU; urolithiasis), Imerslund-Gräsbeck syndroom (IGS), multidrug resistance 1 (MDR1) en neuronale ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6). HUU was niet opgenomen in het projectvoorstel, maar werd toch opgenomen in de studie omdat inmiddels is gebleken dat de aandoening ook voorkomt bij de Australische herder. Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de 1-bp deletie ([GenBank:NC_006587.3] nt 82198105ic: C/-) in het gen *HSF4* die aanleiding geeft tot HC (Mellersh et al., 2006), de c.3G>A AMN cDNA mutatie die aanleiding geeft tot IGS (He et al., 2005) en de mutatie ([GenBank:NC_006612.3] nt 32247875ic: T/C) in *CLN6* die aanleiding geeft tot NCL6 (Katz et al., 2011) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de c.616G>T mutatie in *SLC2A9* die aanleiding geeft tot HUU (Bannasch et al., 2008) en de 4-bp deletie ([GenBank:NC_006596.3] nt 13726594-7 ic: ATAG/----) in *ABCB1* die aanleiding geeft tot MDR1 (Mealey et al., 2001) gebeurde via een TaqMan assay en genotypering van de c.588+462_588+8260del7799bp mutatie in *NHEJ1* die aanleiding geeft tot CEA (Parker et al., 2007) gebeurde via PCR gevolgd door gelelektroforese.

Samenvattende tabel resultaten Australische herder. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	CEA	HC	HUU	IGS	MDR1	NCL6
Wt/Wt	93,8	84,4	93,8	100,0	46,9	100,0
Wt/Mut	6,3	15,6	6,3	0,0	46,9	0,0
Mut/Mut	0,0	0,0	0,0	0,0	6,3	0,0
Wt	96,9	92,2	96,9	100,0	70,3	100,0
Mut	3,1	7,8	3,1	0,0	29,7	0,0

Collie eye anomalie (CEA) is een autosomaal recessief overervende oogaandoening die wordt veroorzaakt door een deletiemutatie in intron 4 van het *NHEJ1* gen (Parker et al., 2007). De mutatie was wellicht reeds aanwezig in de voorloper van de nauw verwante rassen Australische herder, collie, border collie (zie hieronder) en de sheltie. De aandoening werd inmiddels ook aangetroffen in een 10-tal andere rassen en genetische heterogeniteit werd aangetoond. Zo is de mutatie verantwoordelijk voor CEA in bepaalde terriërs zeker verschillend van diegene die hier werd getest.

Van de 32 onderzochte dieren waren 2 drager voor de mutatie, wat neerkomt op een frequentie van 3,1% voor het mutant allel. De frequentie aan dragers is aanzienlijk lager dan die gevonden bij de border collie (15,8%). Dit was ook zo in een retrospectieve studie uitgevoerd in Zwitserland (zie hieronder en Walser-Reinhardt et al., 2009).

Cataract (hereditary, HC) is bij de Australische herder wellicht een autosomaal dominant overervende oogaandoening die wordt veroorzaakt door een deletiemutatie in het gen *HSF4* (Mellersh et al., 2006). Cataract is een genetisch heel heterogene aandoening met soms meerdere verschillende mutaties binnen hetzelfde ras. De vorm waarvan hier sprake is een early onset. In dezelfde studie werd in hetzelfde gen een insertiemutatie gevonden die bij de Staffordshire bull terriër en de Boston terriër aanleiding geeft tot een autosomaal recessief overervende vorm. In een navolgende studie uitgevoerd door dezelfde groep kon het type overerving bij de Australische herder ook niet met zekerheid worden vastgepinde en werd tevens aangetoond dat binnen dit ras nog andere, niet geïdentificeerde, mutaties verantwoordelijk voor bepaalde vormen van cataract aanwezig zijn (Mellersh et al., 2009). De beschreven en in onze studie getypeerde mutatie moet als een risicofactor worden aanzien. Dieren die vrij zijn van de mutatie kunnen nog altijd cataract ontwikkelen als gevolg van een andere mutatie.

In onze studie werden 5 heterozygoten aangetroffen op 32 geteste dieren, wat neerkomt op een frequentie van 15,6%. Gezien de wellicht dominante overerving van deze vorm van HC zullen deze dieren dus een groot risico lopen de aandoening te ontwikkelen. Homozygoot mutante dieren werden niet aangetroffen. De frequentie van het mutant HC allel is 7,8%, wat vrij hoog is voor een dominante mutatie die zich relatief snel doorzet. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens van HC beschikbaar voor de Australische herder in andere landen. Wel werd eerder op basis van klinische studies aangetoond dat cataract over het algemeen vrij veel voorkomt. Een mogelijke verklaring voor de relatief hoge frequentie is dat cataract niet als ernstig wordt beschouwd en nog te weinig wordt opgenomen in fokschema's.

Hyperuricosuria (HUU; urolithiasis) is een autosomaal recessieve aandoening van de urinewegen die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SLC2A9* gen (Bannasch et al., 2008). Bij een uitgebreide screening van meer dan 3000 honden behorend tot 127 verschillende rassen werd de mutatie, naast de dalmatiër waar alle dieren homozygoot mutant zijn, aangetroffen in 10 rassen waaronder de Australische herder, Duitse herder en labrador retriever, die werden opgenomen in deze studie (Karmi et al., 2010). Deze auteurs schatten de frequentie van het aantal dragers bij de Australische herder in de VS op 3,46% (142 geteste dieren). In onze studie troffen we 2 dragers aan op 32 geteste dieren of 6,3% dragers.

Imerslund-Gräsbeck syndroom (IGS) (Intestinale cobalamine (vitamine B12) malabsorptie; selectieve cobalamine malabsorptie; megaloblastische anemie 1 (MGA1)) is een autosomaal recessieve aandoening die bij de Australische herder wordt veroorzaakt door een mutatie in

het *AMN* gen (He et al., 2005), dus een verschillend gen dan IGS bij de border collie (zie daar).

De mutatie werd niet aangetroffen bij 31 geteste dieren. De frequentie van het mutante allel is dus laag ($< 0,016$) bij de Australische herder. Frequentiegegevens over de aandoening in het buitenland zijn niet beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur.

Multidrug resistance 1 (MDR1) is een partieel dominant kenmerk dat wordt veroorzaakt door een deletiemutatie in het *ABCBI* gen (voorheen *MDR1* gen) (Mealey et al., 2001). MDR1 is geen ziekte maar homozygoot mutante dieren hebben een sterk verhoogde gevoeligheid voor meerdere geneesmiddelen en vertonen neurotoxische verschijnselen waarvan de ernst afhangt van de mate van overdosering. Heterozygote dieren zijn ook meer gevoelig dan homozygoot normale dieren, maar in mindere mate dan de homozygoot mutante. Bepaling van het MDR1 genotype is dus belangrijk om overdosering van de betreffende geneesmiddelen te voorkomen.

De frequentie homozygoot mutante dieren in onze studie was 6,3% (2 dieren op 32) en het aantal heterozygoten was 46,9% (15 dieren op 32). De frequentie van het mutante allel is dus 29,7%. In Duitsland werd de frequentie van het mutant allel bij de Australische herder geschat op 20 tot 22% (Geyer et al., 2005; Gramer et al., 2011). In de VS variëren de schattingen van 17% tot 29% (Neff et al., 2004; Mealey en Meurs, 2008) en in het VK werd de frequentie geschat op 46% (28 geteste dieren, Tappin et al., 2012). In Japan en Australië werd de frequentie geschat op 33% en 43%, maar het betreft hier respectievelijk slechts 9 en 14 getypeerde dieren (Kawabata et al., 2005; Mealey et al., 2005).

De mutatie lijkt dus wereldwijd vrij hoog te zijn in de Australische herder.

Neuronale ceroid lipofuscinosis 6 (NCL6) is een autosomaal recessief overervende neurodegeneratieve aandoening veroorzaakt door een mutatie in het *CLN6* gen (Katz et al., 2011).

De mutatie werd niet aangetroffen in onze studie ($n = 32$).

De auteurs van de originele publicatie testten naast de populatie waarin de mutatie werd aangetroffen 637 niet aangetaste dieren en vonden daarbij geen enkele drager. De frequentie van NCL6 is dus wellicht wereldwijd heel laag. Wel blijkt er nog een andere vorm van NCL aanwezig te zijn in de Australische herder.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor IGS en NCL6 werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Van de zes onderzochte mutaties vergt MDR1 duidelijk het meeste aandacht. Zoals min of meer verwacht op basis van resultaten in andere landen is de frequentie van de mutatie hoog

(29,6%) bij de Australische herder. Genotypering en inschakeling in fokprogramma's is dan ook wenselijk voor dit ras. Daar MDR1 op zich geen ziekte is hoeven zeker geen drastische maatregelen genomen te worden om de frequentie (snel) te doen dalen. Genotypering wordt in de eerste plaats sterk aangeraden om de eventuele medicatie van de dieren aan hun genotype te kunnen aanpassen. Dit kan dan gepaard gaan met een verantwoorde partnerkeuze zodanig dat de frequentie van de mutatie geleidelijk aan kan dalen. Uitsluiten van dieren alleen op basis van hun MDR1 genotype is in de huidige toestand niet verantwoord wegens de negatieve impact die dat zou hebben op de genetische diversiteit van het ras.

Routinematige genotypering van de HC mutatie wordt aangeraden daar de frequentie van aangetaste dieren vrij hoog is (15,6%). Deze vorm van cataract erft dominant over wat betekent dat uiteindelijk alle dieren met de mutatie de problemen gepaard aan deze oogziekte zullen ontwikkelen.

Voor de aandoeningen CEA en HUU is de situatie niet zo eenduidig. De frequentie van de mutatie is eerder laag (3,1%) en HUU is meestal een milde aandoening waarbij een aantal dieren zelfs de symptomen niet ontwikkelen. Routinematige genotypering lijkt ons voor deze aandoeningen enkel nuttig in families/lijnen waarin de aandoening eerder werd aangetroffen of waarbij dieren van een dergelijke lijn werden ingekruist.

Border collie

Voor de border collie werden 6 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft de aandoeningen collie eye anomalie (CEA), cyclische neutropenie (CN), Imerslund-Gräsbeck syndroom (IGS), multidrug resistance 1 (MDR1), neuronale ceroid lipofuscinosis 5 (NCL5) en primaire lensluxatie (PLL). De DNA-test voor IGS werd pas recent beschreven en was net als de test voor PLL niet opgenomen in het projectvoorstel. De DNA-test voor PLL werd oorspronkelijk beschreven voor terriërs, maar er waren aanwijzingen dat ze ook zou voorkomen bij de border collie. Vandaar dat we besloten om deze test ook op te nemen in de studie. Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de 1-bp insertie ([GenBank:NC_006585.3] nt 28663129-30: -/A) in het *AP3B1* gen die aanleiding geeft tot CN (Benson et al., 2003), de c.8392delC mutatie in *CUBN* die aanleiding geeft tot IGS (Owczarek-Lipska et al., 2013), de mutatie ([GenBank:NC_006604.3] nt 30574637: C/T) in *CLN5* die aanleiding geeft tot NCL5 (Melville et al., 2005) en de mutatie ([GenBank:NC_006585.3] nt 40782144: G/A) in *ADAMST17* die aanleiding geeft tot PLL (Farias et al., 2010) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de 4-bp deletie ([GenBank:NC_006596.3] nt 13726594-7 ic: ATAG/----) in het *ABCBI* gen die aanleiding geeft tot MDR1 (Mealey et al., 2001) gebeurde via een TaqMan assay en genotypering van de 7,8-kb deletie (28,697,542-28,705,340 op chr 37 van de CanFam2 assembly) in *NHEJ1* die aanleiding geeft tot CEA (Parker et al., 2007) gebeurde via PCR gevolgd door gelelektroforese.

Samenvattende tabel resultaten border collie. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	CEA	CN	IGS	MDR1	NCL5	PLL
Wt/Wt	83,2	100,0	95,7	98,9	100,0	100,0
Wt/Mut	15,8	0,0	4,3	1,1	0,0	0,0
Mut/Mut	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Wt	91,1	100,0	97,9	99,5	100,0	100,0
Mut	8,9	0,0	2,1	0,5	0,0	0,0

Collie eye anomalie (CEA) is een autosomaal recessief overervende oogaandoening die wordt veroorzaakt door een deletiemutatie in intron 4 van het *NHEJ1* gen (Parker et al., 2007). De frequentie van het mutant allel in de door ons onderzochte Belgische border collie populatie is 8,9% (n = 95) waarbij 1,1% aangetaste dieren (mut/mut; 1/95) en 15,8% dragers (wt/mut; 15/95) werden aangetroffen. In een retrospectieve studie over de periode 1999-2007

werd de frequentie van aangetaste border collies in Zwitserland geschat op 0,7% (Walser-Reinhardt et al., 2009). Dit is vergelijkbaar met de 1,1% die wij via genotypering hebben aangetroffen. Daar het Zwitserse onderzoek is gebaseerd op (fenotypisch) oogonderzoek werd de frequentie van dragers niet bepaald (Walser-Reinhardt et al., 2009). In een oudere studie (Bedford PG, 1982 gerefereerd in Lowe et al., 2003) werd de prevalentie van CEA in border collies geschat op 2 à 3 % in de USA en het VK.

Cyclische neutropenie (CN; cyclische hemaetopoesis, grijze collie syndroom) is een autosomaal recessief overervende aandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *AP3B1* gen (Benson et al., 2003). Er zijn in de internationale wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de aandoening in andere landen. Aangezien de mutatie niet werd aangetroffen in onze studie kan worden aangenomen dat de aandoening in de Belgische border collie populatie (heel) zeldzaam is.

Imerslund-Gräsbeck syndroom (IGS) (Intestinale cobalamine (vitamine B12) malabsorptie; selectieve cobalamine malabsorptie; megaloblastische anemie 1 (MGA1)) is een autosomaal recessieve aandoening die bij de border collie wordt veroorzaakt door een mutatie in het *CUBN* gen dat codeert voor cubiline, een van de twee onderdelen van het cubameiwitcomplex aanwezig in de membraan van intestinale cellen en verantwoordelijk voor de opname van het vitamine B12-GIF (gastric intrinsic factor) complex (Owczarek-Lipska et al., 2013). Het tweede onderdeel van cubam is het eiwit amnionless dat wordt gecodeerd door het *AMN* gen. Mutaties in *AMN* zijn verantwoordelijk voor IGS in de Australische herder (zie daar) en de reuzen schnauzer (He et al., 2005).

De frequentie van het mutante *CUBN* allel in onze studie is 2,1%. Er werden 4 dragers gevonden op 94 geteste dieren of een frequentie van 4,3%. Dit is in de lijn met wat Owczarek-Lipska en collega's (2013) in hun recente studie vonden, namelijk 6,2% dragers. Deze frequentie werd bepaald op ongeveer 200 willekeurig gekozen dieren, maar nadere gegevens over de herkomst van de dieren werd niet gegeven. Er werden nog geen andere frequentiebepalingen in de wetenschappelijke literatuur beschreven.

Multidrug resistance 1 (MDR1) is een partieel dominant kenmerk dat wordt veroorzaakt door een deletiemutatie in het *ABCB1* gen (voorheen *MDR1* gen)(Mealey et al., 2001). MDR1 is geen ziekte maar homozygoot mutante dieren hebben een sterk verhoogde gevoeligheid voor meerdere geneesmiddelen en vertonen neurotoxische verschijnselen waarvan de ernst afhangt van de mate van overdosering. Heterozygote dieren zijn ook meer gevoelig dan homozygoot normale dieren, maar in mindere mate dan de homozygoot mutante. Bepaling van het MDR1 genotype is dus belangrijk om overdosering van de betreffende geneesmiddelen te voorkomen.

De frequentie van het mutant allel in de door ons onderzochte Belgische border collie populatie is 0,5% (1 heterozygoot op 95 geteste dieren). Dit komt ongeveer overeen met de frequentie van het mutante *ABCB1* (*MDR1*) allel in de USA (Mealey, 2008) en Duitsland

(Gramer et al., 2011) die werd geschat op ongeveer 1%. In een Japanse studie werd de frequentie van heterozygoten geschat op 0,49% en die van homozygoten op 0,25% (Mizukami et al., 2012b). De frequentie lijkt dus wereldwijd in de border collie relatief laag, dit in tegenstelling met sommige andere rassen en meer specifiek met de collie waar de frequentie in sommige landen oploopt tot 75%.

Neuronale ceroid lipofuscinosis 5 (NCL5) is een autosomaal recessief overervende neurodegeneratieve aandoening veroorzaakt door een mutatie in het *CLN5* gen (Melville et al., 2005).

De mutatie verantwoordelijk voor NCL5 bij de border collie werd in onze studie niet aangetroffen (n = 95). In een studie uitgevoerd op border collies in Australië werd de frequentie van het mutant *CLN5* allel geschat op ongeveer 3,5% (Melville et al., 2005) op basis van ongeveer evenveel dieren (n = 86) als in onze studie. In dezelfde studie wordt aangegeven dat het mutant *CLN5* allel relatief wijd verspreid is in Australië door het veelvuldig inzetten van enkele kampioenen, die achteraf drager bleken van de mutatie. In een studie uitgevoerd op 403 border collies in Japan verzameld over de periode 2006-2011 werd de frequentie van het mutant *CLN5* allel op ongeveer 8,1% geschat (Mizukami et al., 2011). De auteurs wijzen als mogelijke oorzaak voor deze opvallend hoge frequentie naar het founder effect, wat in een navolgende studie werd bevestigd. In deze vervolgstudie werden de stambomen van aangetaste dieren en dragers over een periode van 2000 tot 2011 bestudeerd en zo kon de mutatie teruggevoerd worden naar enkele dieren geïmporteerd vanuit Australië (Mizukami et al., 2012a). Bovendien bleken deze dieren uit dezelfde lijn te komen, wat aanwijst dat de verantwoordelijke mutatie is ontstaan in een border collie in Australië. Bijgevolg is een mogelijke verklaring waarom de mutatie in onze studie niet werd aangetroffen dat geen dieren uit de Australische of Japanse lijnen in de Belgische border collie populatie werden ingekruist en dat de mutatie ook niet of aan een heel lage frequentie aanwezig is in de ons omringende landen. Daar hierover geen frequentiegegevens beschikbaar zijn kan dit (voorlopig) niet bevestigd worden. Om de mutatie niet te verspreiden in de Belgische populatie van de border collie wordt daarom aangeraden om geïmporteerde dieren te genotyperen voor de *CLN5* mutatie.

Primaire lensluxatie (PLL) is een autosomaal recessief overervende aandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *ADAMST17* gen (Farias et al., 2010). De mutatie werd oorspronkelijk aangetroffen in bull terriërs en Jack Russel terriërs maar nadien ook in een aantal andere rassen, voornamelijk terriërs (Gould et al., 2011). Er dient hierbij ook opgemerkt te worden dat de mutatie niet werd aangetroffen bij aangetaste dieren van onder andere de shar pei, Brittany spaniël en de border collie. Hieruit kan besloten worden dat PLL genetisch heterogeen is en dat verschillende mutaties aanwezig zijn in de hondenpopulatie. We besloten om de mutatie toch te testen in de border collie omdat in de studie van Gould en medewerkers (2011) slechts 1 aangetaste border collie werd getest en omdat de mutatie wel frequent (ongeveer 22%) voorkomt in de Lancashire heeler, een ras nauw verwant met de border collie (Gould et al., 2011; Parker et al., 2007). De mutatie werd echter niet in onze

studie aangetroffen. Dit wijst aan dat PLL in de border collie wordt veroorzaakt door een andere, nog niet beschreven mutatie.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor CN, NCL5 en PLL werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin. Een nuance dient wel gemaakt te worden voor NCL5. Zoals daar vermeld komt de mutatie in bepaalde landen wel (relatief) frequent voor en is het raadzaam om dieren die vanuit het buitenland worden geïmporteerd of worden gebruikt voor kruisingen wel te genotyperen voor de mutatie in het CLN5 gen. Dit voorbeeld toont ook heel goed aan dat voorzichtig moet omgesprongen worden met het extrapoleren van frequentiegegevens uit andere landen en lijnen en bewijst het nut van dit soort studies.

Gezien de relatief hoge frequentie aan CEA dragers (15,8%) is het aan te raden om de DNA-test op te nemen bij het opstellen van fokschema's om de frequentie geleidelijk aan te doen dalen. Hetzelfde kan overwogen voor IGS, hoewel de frequentie aan dragers hier reeds relatief laag is (4,3%). Beide testen kunnen eventueel gelijktijdig uitgevoerd worden.

Gezien de lage frequentie (0,5%) is genotypering van MDR1 bij de border collie enkel nuttig in lijnen/families waar er precedenten zijn of waar er klinische problemen gerelateerd aan de medicatie werden vastgesteld.

Boxer

Voor de boxer werden 2 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) en degeneratieve myelopathie (DM). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest. Genotypering van de 8-bp deletie ([GenBank:NC_006599.3] nt 29270915-29270923) in het *STRN* gen die aanleiding geeft tot ARVC (Meurs et al., 2010) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 26540342: G/A) in *SOD1* die aanleiding geeft tot DM (Awano et al., 2009) gebeurde via een TaqMan assay.

Samenvattende tabel resultaten boxer. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	ARVC	DM
Wt/Wt	82,0	86,3
Wt/Mut	16,0	13,7
Mut/Mut	2,0	0,0
Wt	90,0	93,1
Mut	10,0	6,9

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is een ernstige hartaandoening waarbij aangetaste dieren kunnen sterven zonder ooit de symptomen te hebben vertoond. Het type overerving is waarschijnlijk autosomaal dominant met onvolledige penetrantie. Een oorzakelijke mutatie werd aangetroffen in het *STRN* gen (Meurs et al., 2010). ARVC is echter genetisch heterogeen in de boxer, wat betekent dat nog één of meerdere andere mutaties ARVC kunnen veroorzaken of betrokken zijn bij de ontwikkeling ervan. De penetrantie van de *STRN* mutatie wordt op bijna 100% geschat bij homozygoot mutanten en op ongeveer 82% bij heterozygoten. Recent werd door dezelfde onderzoeksgroep ook aangetoond dat de mutatie in *STRN* sterk is gecorreleerd met een gelijkende hartaandoening bij de boxer, met name gedilateerde cardiomyopathie (DCM) (Meurs et al., 2013).

In onze studie werden 1 homozygoot mutant en 8 heterozygoten aangetroffen op een totaal van 50 getypeerde dieren. Dit komt neer op een frequentie van het mutante allel van 10%.

Er zijn nog geen andere frequentiegegevens beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur.

Degeneratieve myelopathie (DM) is een autosomaal recessief overervende fatale neurodegeneratieve aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet (vanaf 8 jaar)(Awano et al., 2009). De aandoening werd inmiddels aangetroffen bij ruim 20 verschillende rassen waaronder de door ons bestudeerde rassen Australische herder, Duitse

herder, Ierse setter en golden retriever. De mutatie werd door ons ook getest op de Mechelse herder (zie bij die respectievelijke rassen).

Op 51 geteste boxers werden 7 dragers aangetroffen of een frequentie van 13,7%. Homozygoten werden niet gevonden. De frequentie van het mutant allel bedraagt bijgevolg 6,9%. Nagenoeg identieke frequenties werden recent beschreven door Broeckx en medewerkers (2013). Zij typeerden echter slechts 15 dieren en het is niet duidelijk hoeveel daarvan uit België kwamen. Andere frequentiegegevens zijn niet beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur.

Op de website van de Orthopedic Foundation for Animals (<http://www.offa.org>) wordt melding gemaakt van 2519 geteste boxers (op 1/10/2013) en een frequentie van 45% homozygoot mutante dieren en 37% dragers. Dit komt neer op een frequentie van het mutante allel van maar liefst 64%. Een belangrijke kanttekening hierbij is echter dat het hier niet de resultaten zijn van een gerandomiseerde studie, maar van dieren aangeboden in de kliniek, met ongetwijfeld een (sterke) bias naar aangetaste dieren en/of lijnen. Niettemin blijkt de frequentie van DM bij boxers relatief hoog te zijn en een opvolging via genotypering is aan te raden.

Fokadvies

Gezien de relatief hoge frequentie van zowel ARVC als DM bij de boxer en de ernst van de aandoening is routinematige genotypering voor beiden wenselijk zodat met de genotypen rekening kan gehouden worden bij de keuze van fokpartners en het opstellen van fokschema's, zodat de frequentie geleidelijk aan naar beneden kan gehaald worden.

Cavalier King Charles spaniel

Voor de cavalier King Charles spaniel werden 3 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft Duchenne musculaire dystrofie (DMD), Episodic falling syndrome (EFS) en macrothrombocytopenia (MTC). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006606.3] nt 43766144: G/A) in *TUBB1* die aanleiding geeft tot MTC (Davis et al., 2008) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de deletie ([GenBank:NC_006589.3] nt 41325095-41340731 ic) in het *BCAN* gen die aanleiding geeft tot EFS (Gill et al., 2011) gebeurde via PCR gevolgd door gelelektroforese en genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006621.3] nt 26956239 ic: G/T) in het *DMD* gen die aanleiding geeft tot DMD (Walmsley et al., 2010) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment lengte polymorfisme).

Samenvattende tabel resultaten cavalier King Charles spaniel. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	DMD*	EFS	MTC
Wt/Wt	100,0	87,7	32,8
Wt/Mut	0,0	12,3	41,4
Mut/Mut	0,0	0,0	25,9
Wt	100,0	93,9	53,4
Mut	0,0	6,1	46,6

*DMD is een X-chromosoom gebonden aandoening. Mannelijke dieren zijn hemizygot Wt/- of Mut/-

Duchenne musculaire dystrofie (DMD) is een X-chromosoom gebonden recessieve spieraandoening die bij de cavalier King Charles spaniel wordt veroorzaakt door een splice site mutatie waardoor exon 50 van het dystrofine (*DMD*) gen wordt uitgesplitst (Walmsley et al., 2010). Aangetaste dieren vertonen een progressief toenemende spierzwakte en moeten uiteindelijk geëuthanaseerd worden. DMD komt in meerdere rassen voor en hoewel telkens het dystrofine defect is betreft het in een aantal gevallen een verschillende mutatie (zie verder bij golden retriever en rottweiler). Gezien het type overerving wordt verwacht dat meer mannelijke dan vrouwelijke dieren zijn aangetast.

In onze studie werd de mutatie niet aangetroffen bij 58 geteste dieren. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de DMD mutatie in de cavalier King Charles spaniel in andere landen.

Episodic falling syndrome (EFS) is een autosomaal recessieve neurologische aandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *BCAN* gen (Gill et al., 2011). De aanvallen kunnen geïnduceerd worden door inspanningen, stress en opwinding. Ze duiken op tussen een leeftijd van drie maand tot vier jaar en worden gradueel ernstiger. Er wordt behoorlijk wat variatie in de ernst en de frequentie van de aanvallen vastgesteld.

In onze studie troffen we 7 dragers aan op 57 geteste dieren of een frequentie van 12,3%. Homozygote mutante dieren werden niet gevonden. De frequentie van het mutant allel bedraagt bijgevolg 6,1%. In de studie van Gill en medewerkers (2011) werd een nagenoeg identieke frequentie aan dragers gevonden (12,9% of 20 dragers op 155 geteste dieren) in een populatie in de VS.

Macrothrombocytopenia (MTC, ook thrombocytopenia (TC) genoemd) is een autosomaal intermediair overervende aandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *TUBB1* gen (Davis et al., 2008). Dieren met MTC hebben een tekort aan trombocyten (bloedplaatjes) waardoor eventueel problemen met de bloedstolling kunnen ontstaan. Homozygoot mutante dieren hebben beduidend minder bloedplaatjes dan homozygoot normale dieren. De heterozygoten zitten daar ergens tussenin. Een verlaagde hoeveelheid bloedplaatjes kan ook veroorzaakt worden door infecties, medicatie of immunologische storingen. Hierdoor krijgen cavaliërs soms onnodige, onaangepaste of verkeerde medicatie.

De frequentie van de mutatie blijkt in de door ons geteste populatie hoog te zijn (46,6%; n = 58) waarbij 15,9% homozygoot mutant is en 41,4% heterozygoot.

In een Ierse populatie (40 dieren) werd de frequentie homozygoot mutanten bepaald op 12,5% en het aantal heterozygoten op 52,5%, dus in lijn met onze bevindingen. In een populatie van de USA (60 dieren) werd door dezelfde onderzoekers de frequentie homozygoot mutanten bepaald op 47% en het aantal heterozygoten op 45% (Davis et al., 2008). Een mogelijke verklaring voor deze sterke verschillen kon niet worden gegeven.

Fokadvies

Gezien de relatief hoge frequentie aan EFS dragers (12,3%) en de ernst van de aandoening is typering in combinatie met een gepast fokprogramma sterk aan te raden.

De situatie van MTC is te vergelijken met die van MDR1 bij de Australische herder (zie daar). MTC is net als MDR1 vooral van belang voor het toedienen van medicatie. Daar een te laag gehalte aan bloedplaatjes ook kan veroorzaakt worden door secundaire oorzaken wordt soms onnodige of onaangepaste medicatie gegeven. Uitsluiten van dieren alleen op basis van hun MTC genotype is zeker niet verantwoord gezien de hoge frequentie van de mutatie en de eerder beperkte problemen die ermee gepaard gaan. Routinematige genotypering wordt echter aangeraden om het voorschrijfgedrag aan het MTC genotype te kunnen aanpassen.

Routinematige genotypering van DMD heeft weinig nut vanwege de (heel) lage frequentie en wordt enkel aangeraden indien zich een geval in de familie of lijn voordoet.

Duitse herder

Voor de Duitse herder werden 5 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft anhidrotische ectodermale dysplasie (AED, XHED), degeneratieve myelopathie (DM), hyperuricosuria (HUU; urolithiasis), mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) en renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006621.3] nt 54511433: G/A in het *EDA* gen die aanleiding geeft tot XHED (Casal et al., 2005) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment lengte polymorfisme). Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 26540342: G/A) in *SOD1* die aanleiding geeft tot DM (Awano et al., 2009), de mutatie ([GenBank:NC_006588.3] nt 741429 ic: G/A) in *GUSB* die aanleiding geeft tot MPS VII (Ray et al., 1998), de mutatie ([GenBank:NC_006587.3] nt 42186445: A/G) in *FLCN* die aanleiding geeft tot RCND (Lingaas et al., 2003) en de c.616G>T mutatie in *SLC2A9* die aanleiding geeft tot HUU (Bannasch et al., 2008) gebeurde via een TaqMan assay.

Samenvattende tabel resultaten Duitse herder. Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.

Frequentie %	DM	HUU	MPSVII	RCND	XHED*
Wt/Wt	63,3	100,0	99,0	100,0	100,0
Wt/Mut	30,6	0,0	1,0	0,0	0,0
Mut/Mut	6,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Wt	78,6	100,0	99,5	100,0	100,0
Mut	21,4	0,0	0,5	0,0	0,0

*XHED is een X-chromosoom gebonden aandoening. Mannelijke dieren zijn hemizygoot Wt/- of Mut/-

Anhidrotische ectodermale dysplasie (AED, XHED) is een recessieve X-chromosoom gebonden overervende ziekte, waardoor ze meer voorkomt bij reuen dan bij teven, die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *EDA* gen (Casal et al., 2005).

In onze studie (n = 98) werd de oorzakelijke mutatie niet aangetroffen waaruit we kunnen besluiten dat de frequentie laag tot zeer laag is in de Belgische populatie van de Duitse herder. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de XHED mutatie in andere landen.

Degeneratieve myelopathie (DM) is een autosomaal recessief overervende fatale neurodegeneratieve aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet

(vanaf 8 jaar) en die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SOD1* gen (Awano et al., 2009). De eerst opduikende symptomen zijn ataxie (ongecoördineerd bewegen) en zwakte van de achterpoten. Veel dieren moeten binnen het jaar na het opduiken van de symptomen worden geëuthanaseerd.

Uit onze studie blijkt dat de aandoening in België een hoge frequentie kent. Zes van de 98 geteste dieren zijn aangetast (homozygoot mutant) terwijl nog eens 30 drager zijn (30,6%). De frequentie van het mutant allel is 21,4%. Deze cijfers liggen in lijn met wat Broeckx en medewerkers (2013) beschreven voor een populatie afkomstig uit België, Nederland en Duitsland. Zij vonden op een totaal van 73 dieren 25% dragers en een frequentie van het mutante allel van 15%.

De hoge frequentie van DM is wellicht mede te verklaren door het relatief late optreden van de aandoening. In veel gevallen is reeds met de dieren gefokt voor de eerste symptomen optreden. Er dient eveneens opgemerkt te worden dat niet alle homozygoot mutante dieren de ziekte daadwerkelijk ontwikkelen. Het aantal asymptomatisch homozygoot mutante dragers wordt geschat op 5 à 10%. Deze verlaagde penetrantie toont aan dat er een invloed is van modifierende genen en/of het milieu (Awano et al., 2009; Tsai et al., 2012).

Op de website van de Orthopedic Foundation for Animals (<http://www.offa.org>) wordt melding gemaakt van 3519 geteste dieren (op 1/10/2013) en een frequentie van 17% homozygoot mutante dieren en 32% dragers. Het betreft hier echter niet de resultaten van een gerandomiseerde studie, maar van dieren aangeboden in de kliniek met mogelijk een bias naar aangetaste dieren en/of lijnen. Niettemin geeft het een indicatie over de prevalentie van DM bij de Duitse herder in de VS en kunnen we vaststellen dat de bevindingen in lijn liggen met de onze (zie tabel). Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de DM mutatie in andere landen wat betreft de Duitse herder, wel werd de mutatiefrequentie in de Pembroke Welsh corgi in Japan bepaald op maar liefst 69,7% (Chang et al., 2013).

Hyperuricosuria (HUU; urolithiasis) is een autosomaal recessieve aandoening van de urinewegen die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SLC2A9* gen (Bannasch et al., 2008). Bij een uitgebreide screening van meer dan 3000 honden behorend tot 127 verschillende rassen werd de mutatie, naast de dalmatiër waar alle dieren homozygoot mutant zijn, aangetroffen in 10 rassen waaronder de Australische herder, Duitse herder en labrador retriever die werden opgenomen in deze studie (Karmi et al., 2010). Deze auteurs schatten de frequentie van het mutante allel bij de Duitse herder op 2,6% (114 geteste dieren).

In onze studie werd de mutatie niet aangetroffen (n = 100). De frequentie van het mutante allel is dus laag tot heel laag in de Duitse herder.

Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) is een autosomaal recessief overervende lysosomale stapelingsziekte die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *GUSB* gen (Ray et al., 1998). Zoals typisch is voor lysosomale stapelingsziekten kent ook MPS VII een progressief verloop en moeten de aangetaste dieren uiteindelijk geëuthanaseerd worden.

Behandelingsmogelijkheden via genterapie worden meer en meer onderzocht. De meeste stapelingsziekten bij honden staan beschreven als zeldzaam tot heel zeldzaam.

Hoewel geen systematische studies naar de frequentie van de MPS VII mutatie zijn beschreven lijkt MPS VII bij de Duitse herder ook eerder zeldzaam. We vonden in onze studie 1 drager op 96 geteste dieren.

Renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND) is een type niertumor die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *FLCN* gen (folliculin, vroeger aangeduid als BHD gen)(Lingaas et al., 2003).

In onze studie werden geen mutante allelen aangetroffen op 96 geteste dieren. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de RCND mutatie in andere landen.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor XHED, HUU en RCND werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin. Gezien de lage frequentie (0,5%) is genotypering van MPS VII bij de Duitse herder enkel nuttig in lijnen/families waar er precedenten zijn.

Gezien de hoge frequentie van de DM mutatie (21,4%) is het aan te raden om de DNA-test op te nemen bij het opstellen van fokschema's om de frequentie geleidelijk aan te doen dalen. De hoge frequentie betekent ook dat zeker dragers en eventueel ook homozygoten niet systematisch uit de fok mogen geweerd worden om de genetische diversiteit niet in het gedrang te brengen. Genotypering in combinatie met een weloverwogen partnerkeuze is de aangewezen manier om de frequentie geleidelijk aan terug te dringen.

Golden retriever

Voor de golden retriever werden 6 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft degeneratieve myelopathie (DM), Duchenne musculaire dystrofie (DMD), Golden Retriever PRA 1 (GR-PRA1), Osteogenesis imperfecta (OI), Progressieve rod-cone degeneratie (PRCD) en recessieve dystrofe epidermolysis bullosa (RDEB). De in het projectvoorstel vermelde test voor sensoric ataxic neuropathy (SAN) werd niet uitgevoerd. SAN is een mitochondriale aandoening. Bij nader onderzoek is gebleken dat de ziekte heel heterogeen is doordat heel wat dieren een mengeling hebben van normale en mutante mitochondriën en het niet duidelijk is hoeveel mutante mitochondriën procentueel aanwezig moeten zijn om de aandoening te ontwikkelen (Baranowska et al., 2009). DM was oorspronkelijk niet opgenomen, maar werd uitgevoerd omdat inmiddels werd gerapporteerd dat de aandoening ook bij de golden retriever voorkomt. Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van ([GenBank:NC_006621.3] nt 27926946 ic: A/G in het *DMD* gen die aanleiding geeft tot DMD (Sharp et al., 1992), de 1-bp insertie ([GenBank:NC_006619.3] nt 26145746) in *SLC4A3* die aanleiding geeft tot GR-PRA1 (Downs et al., 2011) en de mutatie ([GenBank:NC_006591.3] nt 26193593 ic: G/C) in *COL1A1* die aanleiding geeft tot OI (Campbell et al., 2000) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 26540342: G/A) in *SOD1* die aanleiding geeft tot DM (Awano et al., 2009) gebeurde via een TaqMan assay. Genotypering van de (TGC>TAC) mutatie in het 2^{de} codon van het *PRCD* gen die aanleiding geeft tot PRCD (Zangerl et al., 2006) en de mutatie ([GenBank:NC_006602.3] nt 40538034: G/C) in *COL7A1* die aanleiding geeft tot RDEB (Baldeschi et al., 2003) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment lengte polymorfisme).

Samenvattende tabel resultaten golden retriever. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	DM	DMD*	GR-PRA1	OI	PRCD	RDEB
Wt/Wt	100,0	100,0	85,9	100,0	92,4	100,0
Wt/Mut	0,0	0,0	14,1	0,0	5,4	0,0
Mut/Mut	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0
Wt	100,0	100,0	92,9	100,0	95,1	100,0
Mut	0,0	0,0	7,1	0,0	4,9	0,0

*DMD is een X-chromosoom gebonden aandoening. Mannelijke dieren zijn hemizygoot Wt/- of Mut/-

Degeneratieve myelopathie (DM) is een autosomaal recessief overervende fatale neurodegeneratieve aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet (Awano et al., 2009). Zie ook bij de boxer en Duitse herder.

De mutatie werd niet aangetroffen bij de 91 getypeerde dieren. Zoals hierboven vermeld was oorspronkelijk niet voorzien om de aandoening te testen bij de golden retriever. Ze werd toch meegenomen omdat er melding was van gemaakt dat de aandoening ook voorkomt bij de golden retriever. Op de website van de Orthopedic Foundation for Animals (<http://www.offa.org>) wordt melding gemaakt van 138 geteste golden retrievers waarvan 2 aangetast en 3 dragers. DM werd eveneens getest door Broeckx en medewerkers (2013). Net als wij vonden zij het mutante allel niet ($n = 62$). We kunnen er dan ook vanuit gaan dat de frequentie van DM bij de golden retrievers in België momenteel heel laag is.

Duchenne musculaire dystrofie (DMD) is een X-chromosoom gebonden recessieve spieraandoening die bij de golden retriever wordt veroorzaakt door een splice site mutatie waardoor exon 7 wordt uitgesplitst (Sharp et al., 1992).

In onze studie konden we de mutatie niet vinden ($n = 90$). In de heel beperkte populatie ($n = 19$) getest door Broeckx en medewerkers (2013) werd de mutatie evenmin aangetroffen. Frequentie gegevens van andere landen zijn niet beschikbaar.

We kunnen er vanuit gaan dat de frequentie van DMD bij de golden retrievers in België en wellicht wereldwijd heel laag is.

Golden Retriever PRA 1 (GR-PRA1) is een autosomaal recessieve oogaandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SLC4A3* gen (Downs et al., 2011). PRA is in de golden retriever, net als in nogal wat andere rassen, genetische heterogeen. Downs en medewerkers (2011) schatten dat de GR-PRA1 mutatie verantwoordelijk is voor ongeveer 56% van alle PRA gevallen bij de golden retriever, maar aanzienlijke verschillen tussen de bestudeerde landen (Canada, Finland, Frankrijk, VK, VS en Zweden) onderling werden opgemerkt.

Van de in onze studie geteste golden retrievers ($n = 85$) waren er 12 drager (14,1%). Homozygoot mutante dieren werden niet aangetroffen. De frequentie van het mutant allel werd berekend op 7,1%. Downs en medewerkers (2011) schatten de frequentie van het mutante allel op ongeveer 2% in Frankrijk ($n = 89$), 4% in het VK ($n = 108$), 0% in de VS ($n = 148$) en 6% in Zweden ($n = 109$). De afwezigheid van de mutatie in de VS geeft aan dat de mutatie wellicht is ontstaan in een Europese lijn.

Osteogenesis imperfecta (OI) is een autosomale huidaandoening die wellicht dominant overerft en bij de golden retriever wordt veroorzaakt door een mutatie in het *COL1A1* gen (Campbell et al., 2000). Type I collageenvezels bestaan uit polypeptideketens van *COL1A1* en *COL1A2*. Bij de beagle werd een mutatie die OI veroorzaakt aangetroffen in het *COL1A2* gen (Campbell et al., 2001). Dit toont aan dat OI genetisch heterogeen is en dat mogelijk verschillende mutaties binnen hetzelfde ras aanwezig zijn.

In onze studie werd de mutatie niet aangetroffen (n = 90). Er zijn ook geen gegevens beschikbaar over de frequentie in andere landen. We kunnen er vanuit gaan dat de frequentie van OI bij de golden retrievers in België en wellicht wereldwijd heel laag is.

Progressieve rod-cone degeneratie (PRCD) is een autosomaal recessieve oogaandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het PRCD gen (Zangerl et al., 2006). De mutatie/aandoening wordt aangetroffen bij meer dan twintig rassen waaronder de golden retriever en labrador retriever (zie daar).

In onze studie werden 5 dragers en 2 homozygoot mutante golden retrievers aangetroffen op een totaal van 92. Dit komt neer op een frequentie van het mutante allel van 4,9%. Er zijn geen frequentiegegevens over andere landen beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur.

Recessieve dystrofe epidermolysis bullosa (RDEB, vroeger DEB) is een autosomaal recessieve huidaandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *COL7A1* gen (Baldeschi et al., 2003).

De mutatie werd niet aangetroffen in onze studie (n = 90). Er zijn ook geen gegevens beschikbaar over de frequentie in andere landen. We kunnen er vanuit gaan dat de frequentie van RDEB bij de golden retrievers in België en wellicht wereldwijd heel laag is.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor DM, DMD, OI en RDEB werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Gezien de relatief hoge frequentie aan GR-PRA1 dragers (14,1%) is het aan te raden om de DNA-test op te nemen bij het opstellen van fokschema's om de frequentie geleidelijk aan te doen dalen. Interessant hierbij zijn de verschillen per land, waarbij vooral opvalt dat de mutatie niet werd aangetroffen in de VS. Dit en gegevens binnen Europa wijzen aan dat de mutatie in Europa is ontstaan en dat er sterke lijnverschillen zijn. Dit is een element waarmee bij de fok kan/dient rekening gehouden te worden.

Hoewel de PRCD mutatiefrequentie relatief laag is (4,9%), is het ook niet onbeduidend en kan de DNA-test best gelijktijdig met die voor GR-PRA1 uitgevoerd worden.

Ierse setter

Voor de Ierse setter werden 5 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft leukocyt adhesie deficiëntie (CLAD), degeneratieve myelopathie (DM), globoid cell leukodystrophy (GCL, ook aangeduid als ziekte van Krabbe), en progressieve retina atrofie (PRA) rod cone dysplasie 1 (PRA-rcd1) en 4 (PRA-rcd4). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest. De in het projectvoorstel voorgestelde test voor hemofilie A werd vervangen door de meer relevante, recent ontwikkelde test voor PRA-rcd4 (LOPRA).

Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 38537012 ic: G/C) in *ITGB2* die aanleiding geeft tot CLAD (Kijas et al., 1999), de mutatie ([GenBank:NC_006585.3] nt 91747714 ic: G/A) in *PDE6B* die aanleiding geeft tot RCD1 (Suber et al., 1993) en de 1-bp insertie ([GenBank:NC_006599.3] nt 22907389 ic: -/C) in *C17H2orf71* die aanleiding geeft tot RCD4 (Downs et al., 2013) gebeurde via PCR gevolgd door sequentiebepaling. Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 26540342: G/A) in *SOD1* die aanleiding geeft tot DM (Awano et al., 2009) gebeurde via een TaqMan assay. Genotypering van de 78-bp insertie ([GenBank:NC_006590.3] na positie nt 59294627 ic) in *GALC* die aanleiding geeft tot GCL (McGraw en Carmichael, 2006) gebeurde via PCR gevolgd door gelelektroforese.

Samenvattende tabel resultaten Ierse setter. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	CLAD	DM	GCL	RCD1	RCD4
Wt/Wt	100,0	100,0	100,0	100,0	60,5
Wt/Mut	0,0	0,0	0,0	0,0	31,4
Mut/Mut	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1
Wt	100,0	100,0	100,0	100,0	76,2
Mut	0,0	0,0	0,0	0,0	23,8

Canien leukocyt adhesie deficiëntie (CLAD) type I is een autosomaal recessieve aandoening van het immuunsysteem veroorzaakt door een mutatie in het *ITGB2* gen. Aangetaste dieren zijn heel gevoelig voor allerlei infecties en sterven hier meestal aan. In de publicatie waarin de oorzakelijke mutatie voor het eerst werd beschreven werd een frequentie van het mutant allel van ongeveer 4,5% gevonden (uitsluitend dragers; 18 op 203 geteste dieren)(Kijas et al., 1999). In een vervolgstudie werden door deze auteurs Ierse setters getest afkomstig uit 10 verschillende landen waaronder België. Van de 46 geteste dieren afkomstig uit België waren 3 drager of een frequentie van het mutant allel van 3,2%. In de Zweedse

populatie van Ierse setters was dit 13,4% (waarbij 2/164 aangetaste dieren), in de Finse 6,9% (5/36) en in de Nederlandse 4,2% (3/36). Over de 10 landen heen bekeken was de frequentie 11,2% (van sommige landen waren er slechts enkele dieren en de Zweedse populatie maakt bijna de helft uit van het totaal aantal geteste dieren, met name 164/339). Uit de publicatie is niet duidelijk op basis waarvan de stalen werden verzameld. De voornaamste conclusie was dat de mutatie werd aangetroffen in alle landen (Kijas et al., 2000). In twee latere studies werd de frequentie van dragers geschat op 13% (7 op 54 dieren) in de VS (Fouremant et al., 2002) en 7,6% in Australië (7 op 87 dieren) (Jobling et al., 2003). Nog iets recenter werd de frequentie van het mutant CLAD allel in Duitsland geschat op 11% (Pfeiffer en Brenig, 2005).

Het feit dat in deze studie de CLAD mutatie niet werd aangetroffen (n = 85) wijst aan dat de frequentie van het mutant allel efficiënt werd gereduceerd, gebruikmakend van de sinds meer dan 10 jaar beschikbare DNA-test en aangepaste fokschema's.

Degeneratieve myelopathie (DM) is een autosomaal recessief overervende fatale neurodegeneratieve aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet (vanaf 8 jaar) (Awano et al., 2009). Zie ook de beschrijving voor DM bij de Duitse herder. De DM test was niet opgenomen in het projectvoorstel wat betreft de Ierse setter. De test werd toch meegenomen omdat de aandoening volgens de Orthopedic Foundation for Animals (<http://www.offa.org>) ook voorkomt bij de Ierse setter. In onze studie werd de mutatie echter niet aangetroffen bij dit ras (n = 86). Op de aangehaalde website wordt melding gemaakt van 11 geteste Ierse setters waarvan 1 aangetaste en 1 drager. Andere frequentiegegevens zijn niet beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur.

Globoid cell leukodystrophy (GCL) is een autosomaal recessieve aandoening van het metabolisme veroorzaakt door een mutatie in het *GALC* gen. Het is een progressief ernstiger wordende aandoening leidend tot verlamming en uiteindelijk de dood van het dier. De auteurs die de oorzakelijke mutatie beschreven vonden 3 dragers op 24 geteste Ierse setters uit verschillende families in de VS en suggereerden op basis daarvan dat de mutatie vrij frequent voorkomt (McGraw en Carmichael, 2006). Andere frequentiegegevens zijn niet beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur. Het kan echter sterk betwijfeld worden dat GCL frequent voorkomt. In onze studie werd het mutante allel niet aangetroffen (n = 86). Daar er niet specifiek werd gefokt tegen GCL kunnen we aannemen dat de frequentie in de Belgische Ierse setter populatie altijd heel laag is (geweest).

Progressieve retina atrofie (PRA) rod cone dysplasie 1 (PRA-rcd1) is een autosomaal recessieve, vroeg optredende oogaandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *PDE6B* gen (Suber et al., 1993). Het aantal dragers van PRA rcd1 werd in de VS geschat op 7,8% (Aguirre et al., 1999). Andere frequentie gegevens zijn niet beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur. Net als voor CLAD werd er de afgelopen jaren routinematig

getest voor de rcd1 mutatie, wat ook hier wellicht de verklaring is waarom de mutatie niet werd aangetroffen in onze studie (n = 86).

Progressieve retina atrofie (PRA) rod cone dysplasie 4 (PRA-rcd4) is een autosomaal recessieve oogaandoening die recent werd beschreven en wordt veroorzaakt door een mutatie in het *C17H2orf71* gen (Downs et al., 2013). Deze auteurs vonden dat de mutatie wereldwijd is verspreid in zowel de Ierse als de Gordon setter en dat aan een hoge frequentie. Hun berekening voor de Ierse setter in de VS en VK kwam op een frequentie van ongeveer 29% voor het mutant allel met daarbij naar schatting 41% dragers en 8,3% aangetaste dieren. Dit komt ongeveer overeen met onze bevindingen zijnde 23,8% voor de allelfrequentie en 8,1% respectievelijk 31,4% voor de aangetaste dieren en dragers. Deze hoge frequentie is wellicht mede te verklaren doordat niet op de aandoening werd geselecteerd vanwege het relatief late optreden (vandaar ook de populaire naam LOPRA voor de aandoening, late onset PRA).

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor CLAD, DM, GCL en RCD1 werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Gezien de hoge frequentie en het late optreden van RCD4 (LOPRA) is het raadzaam om, zeker in eerste instantie, de dragers zoveel mogelijk te blijven gebruiken in verantwoorde fokschema's en met opvolging via een DNA-test, dit om de genetische diversiteit van het ras niet in gevaar te brengen.

Labrador retriever

Voor de labrador retriever werden 6 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft centronucleaire myopathie (CNM), exercise-induced collapse (EIC), hemofilie B (H-B) vermeld in het projectvoorstel werd niet uitgevoerd omdat met de enige beschreven methode (Southern blotting) geen onderscheid te maken is tussen Wt/Wt en Wt/- en werd vervangen door hyperuricosuria (HUU; urolithiasis), myotubulaire myopathie (X-linked) (XLMTM), narcolepsie (NA), en progressieve rod-cone degeneratie (PRCD). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006591.3] nt 55268184 ic) in *DNMI* die aanleiding geeft tot EIC (Patterson et al., 2008), de mutatie ([GenBank:NC_006594.3] nt 22620881: G/A) in *HCRT2* die aanleiding geeft tot NA (Lin et al., 1999) en de (TGC>TAC) mutatie in het 2de codon van het *PRCD* gen die aanleiding geeft tot PRCD (Zangerl et al., 2006) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment polymorfisme). Genotypering van de c.616G>T mutatie in *SLC2A9* die aanleiding geeft tot HUU (Bannasch et al., 2008) en de mutatie ([GenBank:NC_006621.3] nt 118885117: C/A) in *MTMI* die aanleiding geeft tot XLMTM (Beggs et al., 2010) gebeurde via een TaqMan assay. Genotypering van de 249-bp insertie vanaf positie ([GenBank:NC_006584.3] nt 19371989) in *PTPLA* die aanleiding geeft tot CNM (Pelé et al., 2005) gebeurde via PCR gevolgd door gelelektroforese.

Samenvattende tabel resultaten labrador retriever. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	CNM	EIC	HUU	(XL)MTM*	NA	PRCD
Wt/Wt	98,6	72,0	100,0	100,0	100,0	76,9
Wt/Mut	1,4	22,4	0,0	0,0	0,0	19,4
Mut/Mut	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0	3,7
Wt	99,3	83,2	100,0	100,0	100,0	86,6
Mut	0,7	16,8	0,0	0,0	0,0	13,4

*(XL)MTM is een X-chromosoom gebonden aandoening. Mannelijke dieren zijn hemizygoot Wt/- of Mut/-

Centronucleaire myopathie (CNM) is een autosomaal recessieve spieraandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *PTPLA* gen (Pelé et al., 2005).

In onze studie werden 2 dragers aangetroffen op 143 geteste dieren, wat neerkomt op een frequentie van het mutant allel van 0,7%. Dit staat in schril contrast met de resultaten gevonden door Maurer en medewerkers (2012). Zij analyseerden meer dan 7000 labradors afkomstig uit 13 verschillende landen. Ze stelden een hoge frequentie van het mutant allel

vast in het VK (20,3%), de VS (17,7%) en Canada (13%). De frequentie in wat ze aanduiden als continentaal Europa bedraagt eveneens 20,3%. Het is niet duidelijk welke landen hierin vervat zitten noch hoeveel dieren uit elk land afkomstig zijn. Ook kloppen de opgegeven cijfers in de tekst niet met wat ze weergeven in hun tabel 3 en figuur 3. Er lijken geen dieren uit België opgenomen te zijn in deze studie. Hoe dan ook is de aangetroffen frequentie van het mutant allel veel hoger dan wat wij in onze studie vonden en werd in het VK eerder een gelijkaardig hoog percentage aangetroffen (Owczarek-Lipska et al., 2011).

Maurer en medewerkers (2012) konden ook aantonen dat verschillende aangetaste dieren in Duitsland en Frankrijk afstammen van enkele kampioenen uit het VK en dat de mutatie wellicht daar zijn oorsprong heeft en zich nadien over de ganse wereld heeft verspreid. Er werd ook een frequentiebepaling uitgevoerd in Italië en deze auteurs verkregen een resultaat dat meer in lijn ligt met onze bevindingen, namelijk 0,47% (Gentilini et al., 2011).

De sterke regionale verschillen zijn waarschijnlijk terug te voeren tot het (veelvuldig) gebruik van dieren met een oorsprong in lijnen van het VK. Hoewel de frequentie van CNM in België momenteel laag lijkt is de oorsprong van de dieren in het geschetste verband zeker een aandachtspunt.

Exercise-induced collapse (EIC) is een autosomaal recessief overervende neuromusculaire aandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *DNMI* (dynamine) gen. Voor het overige normale dieren krijgen tijdens zware inspanning spierproblemen doordat de communicatie met de zenuwen uitvalt (Patterson et al., 2008).

In onze studie werden 8 aangetaste (5,6%) en 32 dragers (22,4%) aangetroffen op een totaal van 143 getypeerde labrador retrievers of een frequentie van de mutatie van 16,8%.

In de studie van Broeckx en medewerkers (2013) werden 19 homozygoot mutante dieren (29%) en 16 (25%) dragers aangetroffen op een totaal van 65 geteste dieren. Dit komt neer op een frequentie van het mutant allel van 42%. Het opvallend hoge percentage aangetaste dieren (29%) in deze studie in vergelijking met onze resultaten (5,6%) en twee onafhankelijke studies in de VS (3% en 9,9%, zie hieronder) en het feit dat er een sterke afwijking van het Hardy-Weinberg evenwicht was, wijst op een bias in de sampling in deze studie. Een mogelijke verklaring voor deze bias kan zijn dat de stalen oorspronkelijk werden verzameld voor een studie naar heupdysplasie en dat daardoor vooral dieren geselecteerd op conformatie/show werden opgenomen in de testpopulatie. Zoals hieronder is aangegeven werd bij een studie in de VS een hogere frequentie van EIC vastgesteld bij labradors geselecteerd op conformatie/show dan bij labradors gehouden voor andere doeleinden.

In een studie op 400 dieren in de VS werd de frequentie van EIC aangetaste dieren vastgesteld op 3% en het aantal dragers van de mutatie op 37% (Patterson et al., 2008).

In een onafhankelijke studie in de VS werd het aantal aangetaste dieren bepaald op 9,9% en het aantal dragers op 37,2% (Minor et al., 2011). Deze auteurs deelden de geteste labradors ook op volgens "functie" in vier groepen: conformatie/show, pet, jacht en service. De hoogste frequentie aangetaste dieren werd gevonden in de groep conformatie (13,6%) en de laagste in de groep service (1,8%). De groepen jacht en pet zaten daar tussenin met respectievelijk 4,8% en 2,9%. Wat betreft het aantal dragers waren de groepen conformatie en jacht ongeveer

gelijk (37,9% en 38%) en ook hier was de groep service het laagst (17,9%). Het aantal dragers in de groep pet was ongeveer 28%.

Hyperuricosuria (HUU; urolithiasis) is een autosomaal recessieve aandoening van de urinewegen die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SLC2A9* gen (Bannasch et al., 2008). Bij een uitgebreide screening van meer dan 3000 honden behorend tot 127 verschillende rassen werd de mutatie, naast de dalmatiër waar alle dieren homozygoot mutant zijn, aangetroffen in 10 rassen waaronder de Duitse herder en labrador retriever (Karmi et al., 2010). Deze auteurs schatten de frequentie van het mutante allel bij de labrador retriever op 0,26% (1 drager op 384 geteste dieren).

In onze studie werd het mutant allel niet aangetroffen bij 143 geteste dieren. We kunnen dus aannemen dat de frequentie van het mutant allel heel laag is in de labrador retriever in België.

Myotubulaire myopathie (XLMTM; myotubulaire myopathie 1) is een X chromosoom gebonden recessieve aandoening die bijgevolg meer wordt aangetroffen bij mannelijke dan vrouwelijke dieren. De spieraandoening wordt veroorzaakt door een mutatie in het *MTM1* gene coderend voor het myotubularine spiereiwit (Beggs et al., 2010).

De oorzakelijke mutatie werd in onze studie niet aangetroffen (n = 143). Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de MTM1 mutatie in andere landen.

Narcolepsie (NA) is een autosomaal recessief overervende slaapstoornis die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *HCRTR2* gen (Lin et al., 1999).

De oorzakelijke mutatie werd in onze studie niet aangetroffen (n = 143). Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de NA mutatie in andere landen.

Progressieve rod-cone degeneratie (PRCD) is een autosomaal recessieve oogaandoening die bij de labrador retriever wordt veroorzaakt door een mutatie in het *PRCD* gen (Zangerl et al., 2006).

In onze studie werden 5 aangetaste (mut/mut) en 26 dragers (wt/mut) aangetroffen op een totaal van 134 geteste dieren. Dit komt overeen met een frequentie van het mutante PRCD allel van 13,4%. Deze relatief hoge frequentie is wellicht mede te verklaren door het feit dat PRCD een late onset aandoening is. De symptomen zetten zich pas op latere leeftijd door waardoor er dikwijls reeds met de dieren werd gefokt voor de aandoening tot uiting komt. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de PRCD mutatie bij labrador retrievers in andere landen.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor HUU, NA en XLMTM werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Vanwege de hoge frequentie van zowel de EIC mutatie (16,8%) als de PRCD mutatie (13,4%) is het aan te raden om beide DNA-testen op te nemen bij het opstellen van fokschema's om de frequentie geleidelijk aan te doen dalen. De hoge frequentie betekent ook dat best dragers en eventueel ook homozygoten niet systematisch uit de fok geweerd worden om de genetische diversiteit niet in het gedrang te brengen. Genotypering in combinatie met een weloverwogen partnerkeuze is de aangewezen manier om de frequentie geleidelijk aan terug te dringen. We willen hierbij ook nog opmerken dat labrador retrievers die werden geselecteerd op conformatie blijkbaar een hoger risico lopen op EIC (cfr Minor et al., 2011).

Hoewel de frequentie van de CNM mutatie laag is (0,7%) in de Belgische populatie van labrador retrievers, is enige behoedzaamheid hier aangewezen. Deze lage frequentie staat immers in schril contrast met de hoge frequentie opgemerkt in meerdere andere landen en vooral in het VK (>20%). We raden dan ook aan om de CNM DNA-test te laten uitvoeren in combinatie met die voor EIC en PRCD, zeker wanneer dieren vanuit het buitenland of uit lijnen met connecties in het VK worden betrokken bij de fok.

Mechelse herder

Voor de Mechelse herder werden de 5 zelfde DNA testen als beschreven voor de Duitse herder uitgevoerd (zie ook bij de keuze van de onderzochte rassen). Het betreft anhidrotische ectodermale dysplasie (AED), degeneratieve myelopathie (DM), hyperuricosuria (HUU; urolithiasis), mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) en renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND). Voor elk van de aandoeningen wordt vermeld hoeveel dieren (n) werden getest.

Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006621.3] nt 54511433: G/A in het *EDA* gen die aanleiding geeft tot XHED (Casal et al., 2005) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment lengte polymorfisme). Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006613.3] nt 26540342: G/A) in *SOD1* die aanleiding geeft tot DM (Awano et al., 2009), de mutatie ([GenBank:NC_006588.3] nt 741429 ic: G/A) in *GUSB* die aanleiding geeft tot MPS VII (Ray et al., 1998), de mutatie ([GenBank:NC_006587.3] nt 42186445: A/G) in *FLCN* die aanleiding geeft tot RCND (Lingaas et al., 2003) en de c.616G>T mutatie in *SLC2A9* die aanleiding geeft tot HUU (Bannasch et al., 2008) gebeurde via een TaqMan assay.

Samenvattende tabel resultaten Mechelse herder. *Wt = wild type of het normale allel. Mut = het mutante, ziekteverwekkende allel. Wt/Mut dieren zijn heterozygote dragers. Voor recessieve aandoeningen zijn ze zelf niet aangetast, maar ze geven de mutatie door aan 50% van hun nakomelingen.*

Frequentie %	DM	HUU	MPSVII	RCND	XHED*
Wt/Wt	85,9	94,4	100,0	100,0	100,0
Wt/Mut	12,7	4,2	0,0	0,0	0,0
Mut/Mut	1,4	1,4	0,0	0,0	0,0
Wt	92,3	96,5	100,0	100,0	100,0
Mut	7,7	3,5	0,0	0,0	0,0

*XHED is een X-chromosoom gebonden aandoening. Mannelijke dieren zijn hemizygot Wt/- of Mut/-

Anhidrotische ectodermale dysplasie (AED, XHED) is een recessieve X-chromosoom gebonden overervende ziekte waardoor ze meer voorkomt bij reuen dan bij teven (Casal et al., 2005).

In onze studie werd de oorzakelijke mutatie niet aangetroffen (n = 72), net als bij de Duitse herder, waaruit we kunnen besluiten dat de frequentie laag tot zeer laag is in de Belgische populatie van de Mechelse herder.

Degeneratieve myelopathie (DM) is een autosomaal recessief overervende fatale neurodegeneratieve aandoening van het ruggenmerg die zich pas op latere leeftijd doorzet (vanaf 8 jaar)(Awano et al., 2009). De eerst opduikende symptomen zijn ataxie (ongecoördineerd bewegen) en zwakte van de achterpoten. Veel dieren moeten binnen het jaar na het opduiken van de symptomen worden geëuthanaseerd. Zie ook hoger bij de Duitse herder.

Uit onze studie blijkt dat de aandoening in België een relatief hoge frequentie kent, maar niet zo hoog als bij de Duitse herder. Een van de 71 geteste dieren is homozygoot mutant en 9 zijn drager (12,7%). De frequentie van het mutant allel is 7,7% (tegenover 21,4% bij de Duitse herder).

Hyperuricosuria (HUU; urolithiasis) is een autosomaal recessieve aandoening van de urinewegen die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *SLC2A9* gen (Bannasch et al., 2008). Bij een uitgebreide screening van meer dan 3000 honden behorend tot 127 verschillende rassen werd de mutatie, naast de dalmatiër waar alle dieren homozygoot mutant zijn, aangetroffen in 10 rassen waaronder de Duitse herder en labrador retriever (Karmi et al., 2010). Deze auteurs schatten de frequentie van het mutante allel bij de Duitse herder op 2,6% (zie boven). Wat betreft de Mechelse herder werd in deze studie slechts 1 dier getest.

In onze studie werd de mutatie, in tegenstelling met de Duitse herder, wel aangetroffen bij de Mechelse herder. Van de 72 geteste dieren waren er 3 drager en 1 homozygoot mutant, wat neerkomt op een frequentie van het mutant allel van 3,5%.

Mucopolysaccharidosis VII (MPS VII) is een autosomaal recessief overervende lysosomale stapelingsziekte die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *GUSB* gen (Ray et al., 1998). Zoals typisch is voor lysosomale stapelingsziekten kent ook MPS VII een progressief verloop en moeten de aangetaste dieren uiteindelijk geëuthanaseerd worden. De meeste stapelingsziekten bij honden staan beschreven als zeldzaam tot heel zeldzaam. Bij de Duitse herder vonden we een mutatiefrequentie van 0,5% (zie daar).

In onze studie werden geen mutante allelen aangetroffen bij de Mechelse herder (n = 72).

Renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis (RCND) is een type niertumor die wordt veroorzaakt door een mutatie in het *FLCN* gen (folliculin, vroeger aangeduid als BHD gen)(Lingaas et al., 2003).

In onze studie werden geen mutante allelen aangetroffen (n = 72). Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de RCND mutatie in andere landen.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor XHED, MPS VII en RCND werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Gezien de relatief hoge frequentie van de DM mutatie (12,7% dragers) is het aan te raden om de DNA-test op te nemen bij het opstellen van fokschema's om de frequentie geleidelijk aan te doen dalen.

In tegenstelling met de Duitse herder werd de HUU mutatie wel aangetroffen bij de Mechelse herder, maar gezien de relatief lage frequentie (3,5%) en de mildheid van de aandoening (niet alle homozygoot mutante dieren krijgen effectief last) is een routinematige toepassing van de HUU DNA-test niet noodzakelijk en wordt deze enkel aangeraden wanneer er in de lijn/familie precedenten zijn.

Globaal genomen kunnen we stellen dat de bevindingen gedaan bij de Duitse herder ook gelden voor de Mechelse herder en dat nieuwe DNA-testen ontwikkeld voor de Duitse herder best ook geëvalueerd worden bij de Mechelse herder.

Rottweiler

Voor de rottweiler werden 2 DNA testen beschikbaar in het publiek domein uitgevoerd. Het betreft Duchenne musculaire dystrofie (DMD) en Mucopolysaccharidosis I (MPS I).

Genotypering van de ([GenBank:NC_006621.3] nt 26626701 ic: G/T mutatie in het *DMD* gen die aanleiding geeft tot DMD (Winand, 1994) gebeurde via PCR-RFLP (restrictie fragment lengte polymorfisme). Genotypering van de mutatie ([GenBank:NC_006585.3] nt 91534420 ic: G/A) in *IDUA* die aanleiding geeft tot MPS I (Menon et al., 1992) gebeurde via een PCR gevolgd door sequentiebepaling.

Musculaire dystrofie van het type Duchenne (DMD) is een X-chromosoom gebonden recessief overervende spieraandoening die wordt veroorzaakt door een mutatie in het dystrofine gen, verschillende van die vermeld bij de cavalier King Charles spaniel en golden retriever (Winand, 1994).

De mutatie werd niet aangetroffen bij de 91 geteste dieren. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de DMD mutatie bij de rottweiler in andere landen. We kunnen er vanuit gaan dat de frequentie van DMD bij rottweilers in België en wellicht wereldwijd heel laag is.

Mucopolysaccharidosis I (MPS I) is een van de talrijke metabole aandoeningen behorende tot de groep van de lysosomale stapelingsziekten. De aandoening erft autosomaal recessief over en wordt veroorzaakt door een mutatie in het *IDUA* gen (Menon et al., 1992). De mutatie werd oorspronkelijk beschreven voor de Plott hound en nadien bij enkele andere rassen waaronder de rottweiler.

De mutatie werd niet aangetroffen bij de 85 geteste dieren. Er zijn in de wetenschappelijke literatuur geen frequentiegegevens beschikbaar over de MPS I mutatie bij de rottweiler in andere landen. We kunnen er vanuit gaan dat de frequentie van MPS I bij rottweilers in België en wellicht wereldwijd heel laag is.

Fokadvies

De geteste mutaties verantwoordelijk voor DMD en MPS I werden niet aangetroffen in onze studie. Het routinematig opnemen van deze DNA-testen in fokprogramma's heeft dan ook weinig zin.

Algemene conclusies

Over de tien onderzochte rassen heen werden 46 DNA-testen uitgevoerd. Hierbij beschouwen we de test voor dezelfde mutatie uitgevoerd bij verschillende rassen als aparte testen. Bij 25 van deze DNA-testen werd geen enkel mutant allel aangetroffen in het onderzochte ras wat aangeeft dat de frequentie van de aandoening heel laag is en dat routinematige genotypering voor deze mutaties/aandoeningen in het betreffende ras geen zin heeft. Opvallend hierbij is dat alle onderzochte X-chromosoom gebonden mutaties (6) hieronder vallen. Een mogelijke verklaring hiervoor is fenotypische selectie op populaire reuen (hebben slechts 1 X-chromosoom) die vrij zijn voor dit soort aandoeningen. Een andere mogelijke verklaring is dat de betreffende aandoening (heel) zeldzaam was/is en slechts in bepaalde lijnen aanwezig was/is. Bepaalde aandoeningen en bijhorende mutaties werden slechts één keer beschreven en deze mutaties komen mogelijk enkel voor in de door de desbetreffende auteurs onderzochte populatie. Dit is wellicht ook geldig voor een aantal van de autosomale aandoeningen waarvoor de mutatie niet werd aangetroffen en waarover weinig informatie beschikbaar is in de internationale wetenschappelijke literatuur. Dit mag echter niet zomaar veralgemeend worden en een studie zoals door ons uitgevoerd is aangewezen om uitsluitel te brengen.

De resultaten verkregen voor de Mechelse herder geven aan dat het evalueren van de DNA-testen oorspronkelijk ontwikkeld voor de Duitse herder nuttig is. Twee van de vijf onderzochte mutaties werden bij de Mechelse herder aangetroffen. Dat is evenveel als bij de Duitse herder zelf. Opvallend hierbij is dat één van de mutaties (HUU) in onze studie bij de Mechelse herder werd aangetroffen en niet bij de Duitse herder terwijl ze oorspronkelijk bij die laatste werd aangetroffen. De bevindingen gedaan voor de Mechelse herder kunnen geëxtrapoleerd worden naar andere (nauw) verwante rassen. Zo zou het interessant en raadzaam zijn om de mutaties gevonden bij de Duitse herder ook te onderzoeken bij bijvoorbeeld de Groenendaeler, Lakense herder, Tervuurse herder, witte Canadese herder en eventueel zelfs het schipperke, rassen die wegens hun beperkte(re) omvang veel minder bestudeerd worden en waarvoor specifiek geen of heel weinig DNA-testen beschikbaar zijn.

Globaal genomen is de situatie voor de onderzochte aandoeningen vrij gunstig. De belangrijkste aandachtspunten werden aangestipt bij het fokadvies voor elk van de rassen. Opvallend hierbij, maar niet echt verrassend, is dat algemeen genomen de hoogste frequenties worden aangetroffen bij oogaandoeningen. Bij een aantal van deze oogaandoeningen treden de symptomen laat of relatief laat op en andere zoals cataract worden, wellicht onterecht, als niet echt problematisch beschouwd. Het gevolg in beide gevallen is dat geen doorgedreven selectie op de aandoeningen werd gevoerd. Een vergelijkbaar fenomeen doet zich voor bij MDR1 en MTC, wat op zich geen aandoeningen zijn maar waarbij de verantwoordelijke mutaties wel voor problemen kunnen zorgen bij toediening van bepaalde medicaties.

Afsluitend kunnen we stellen dat het nut van DNA-testen wordt aangetoond door de resultaten bekomen voor de Ierse setter. Door doordacht gebruikt te maken van DNA-testen werd de frequentie van de mutaties verantwoordelijk voor CLAD en RCD1 tot een verwaarloosbaar niveau teruggebracht.

Referenties

Aguirre, G.D., Baldwin, V., Weeks, K.M., Acland, G.M., Ray, K.: Frequency of the codon 807 mutation in the cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in Irish setters and other dog breeds with hereditary retinal degeneration. *Journal of Heredity* 90:143-147, 1999.

Awano, T., Johnson, G.S., Wade, C.M., Katz, M.L., Johnson, G.C., Taylor, J.F., Perloski, M., Biagi, T., Baranowska, I., Long, S., March, P.A., Olby, N.J., Shelton, G.D., Khan, S., O'Brien, D.P., Lindblad-Toh, K., Coates, J.R.: Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2794-9, 2009.

Bannasch, D., Safra, N., Young, A., Karmi, N., Schaible, R.S., Ling, G.V.: Mutations in the SLC2A9 gene cause hyperuricosuria and hyperuricemia in the dog. *PLoS Genet* 4:e1000246, 2008.

Baranowska, I., Jäderlund, K.H., Nennesmo, I., Holmqvist, E., Heidrich, N., Larsson, N.G., Andersson, G., Wagner, E.G., Hedhammar, A., Wibom, R., Andersson, L.: Sensory ataxic neuropathy in golden retriever dogs is caused by a deletion in the mitochondrial tRNATyr gene. *PLoS Genet* 5:e1000499, 2009.

Beggs, A.H., Böhm, J., Snead, E., Kozłowski, M., Maurer, M., Minor, K., Childers, M.K., Taylor, S.M., Hitte, C., Mickelson, J.R., Guo, L.T., Mizisin, A.P., Buj-Bello, A., Turet, L., Laporte, J., Shelton, G.D.: MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14697-702, 2010.

Benson, K.F., Li, F.Q., Person, R.E., Albani, D., Duan, Z., Wechsler, J., Meade-White, K., Williams, K., Acland, G.M., Niemeyer, G., Lothrop, C.D., Horwitz, M.: Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nature Genetics* 35:90-6, 2003.

Broeckx, B.J., Coopman, F., Verhoeven, G.E., Van Haeringen, W., van de Goor, L., Bosmans, T., Gielen, I., Saunders, J.H., Soetaert, S.S., Van Bree, H., Van Neste, C., Van Nieuwerburgh, F., Van Ryssen, B., Verelst, E., Van Steendam, K., Deforce, D.: The prevalence of nine genetic disorders in a dog population from Belgium, the Netherlands and Germany. *PLoS One* 8:e74811, 2013.

Campbell, B.G., Wootton, J.A.M., MacLeod, J.N., Minor, R.R.: Sequence of normal canine COL1A1 cDNA and identification of a heterozygous alpha 1(I) collagen Gly208Ala mutation in a severe case of canine osteogenesis imperfecta. *Archives of Biochemistry & Biophysics* 384:37-46, 2000.

- Campbell, B.G., Wootton, J.A.M., Macleod, J.N., Minor, R.R.: Canine COL1A2 mutation resulting in C-terminal truncation of pro-alpha 2(I) and severe osteogenesis imperfect. *Journal of Bone & Mineral Research* 16:1147-1153, 2001.
- Casal, M.L., Scheidt, J.L., Rhodes, J.L., Henthorn, P.S., Werner, P.: Mutation identification in a canine model of X-linked ectodermal dysplasia. *Mamm Genome* 16:524-31, 2005.
- Chang, H.S., Kamishina, H., Mizukami, K., Momoi, Y., Katayama, M., Rahman, M.M., Uddin, M.M., Yabuki, A., Kohyama, M., Yamato, O.: Genotyping Assays for the Canine Degenerative Myelopathy-Associated c.118G>A (p.E40K) Mutation of the SOD1 Gene Using Conventional and Real-Time PCR Methods: A High Prevalence in the Pembroke Welsh Corgi Breed in Japan. *J Vet Med Sci* :, 2013.
- Davis, B., Toivio-Kinnucan, M., Schuller, S., Boudreaux, M.K.: Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *J Vet Intern Med* 22:540-5, 2008.
- Downs, L.M., Wallin-Håkansson, B., Boursnell, M., Marklund, S., Hedhammar, Å., Truvé, K., Hübinette, L., Lindblad-Toh, K., Bergström, T., Mellersh, C.S.: A frameshift mutation in golden retriever dogs with progressive retinal atrophy endorses SLC4A3 as a candidate gene for human retinal degenerations. *PLoS One* 6:e21452, 2011.
- Downs, L.M., Bell, J.S., Freeman, J., Hartley, C., Hayward, L.J., Mellersh, C.S.: Late-onset progressive retinal atrophy in the Gordon and Irish Setter breeds is associated with a frameshift mutation in C2orf71. *Anim Genet* 44:169-77, 2013.
- Farias, F.H., Johnson, G.S., Taylor, J.F., Giuliano, E., Katz, M.L., Sanders, D.N., Schnabel, R.D., McKay, S.D., Khan, S., Gharahkhani, P., O'Leary, C.A., Pettitt, L., Forman, O.P., Boursnell, M., McLaughlin, B., Ahonen, S., Lohi, H., Hernandez-Merino, E., Gould, D.J., Sargan, D., Mellersh, C.S.: An ADAMTS17 Splice Donor Site Mutation in Dogs with Primary Lens Luxation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* :, 2010.
- Fouremant, P., Whiteley, M., Giger, U.: Canine leukocyte adhesion deficiency: Presence of the Cys36Ser beta-2 integrin mutation in an affected US Irish Setter cross-breed dog and in US Irish Red and White Setters. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16:518-523, 2002.
- Gentilini, F., Zambon, E., Gandini, G., Rosati, M., Spadari, A., Romagnoli, N., Turba, M.E., Gernone, F.: Frequency of the allelic variant of the PTPLA gene responsible for centronuclear myopathy in Labrador Retriever dogs as assessed in Italy. *J Vet Diagn Invest* 23:124-6, 2011.
- Geyer, J., Doring, B., Godoy, J.R., Leidolf, R., Moritz, A., Petzinger, E.: Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *J Vet Pharmacol Ther* 28:545-51, 2005.
- Gill, J.L., Tsai, K.L., Krey, C., Noorai, R.E., Vanbellinghen, J-F., Garosi, L.S., Shelton, G.D., Clark, L.A., Harvey, R.J.: A canine BCAN microdeletion associated with Episodic Falling Syndrome *Neurobiology of Disease* :, 2011.

- Gould, D., Pettitt, L., McLaughlin, B., Holmes, N., Forman, O., Thomas, A., Ahonen, S., Lohi, H., O'Leary, C., Sargan, D., Mellersh, C.: ADAMTS17 mutation associated with primary lens luxation is widespread among breeds. *Vet Ophthalmol* 14:378-384, 2011.
- Gramer, I., Leidolf, R., Doring, B., Klintzsch, S., Kramer, EM., Yalcin, E., Petzinger, E., Geyer, J.: Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in dogs. *Vet J* 189:67-71, 2011.
- He, Q., Madsen, M., Kilkenney, A., Gregory, B., Christensen, E.I., Vorum, H., Højrup, P., Schäffer, A.A., Kirkness, E.F., Tanner, S.M., de la Chapelle, A., Giger, U., Moestrup, S.K., Fyfe, J.C.: Amnionless function is required for cubilin brush-border expression and intrinsic factor-cobalamin (vitamin B12) absorption in vivo. *Blood* 106:1447-53, 2005.
- Jobling, A.I., Ryan, J., Augusteyn, R.C.: The frequency of the canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) allele within the Irish Setter population of Australia. *Aust Vet J* 81:763-5, 2003.
- Karmi, N., Brown, E.A., Hughes, S.S., Mclaughlin, B., Mellersh, C.S., Biourge, V., Bannasch, D.L.: Estimated frequency of the canine hyperuricosuria mutation in different dog breeds. *J Vet Intern Med* 24:1337-42, 2010.
- Katz, M.L., Farias, F.H., Sanders, D.N., Zeng, R., Khan, S., Johnson, G.S., O'Brien, DP.: A missense mutation in canine CLN6 in an Australian shepherd with neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biomed Biotechnol* 2011:198042, 2011.
- Kawabata, A., Momoi, Y., Inoue-Murayama, M., Iwasaki, T.: Canine *mdr1* gene mutation in Japan. *J Vet Med Sci* 67:1103-7, 2005.
- Kijas, J.M.H., Bauer, T.R., Gafvert, S., Marklund, S., Trowald-Wigh, G., Johannisson, A., Hedhammar, A., Binns, M., Juneja, R.K., Hickstein, D.D., Andersson, L.: A missense mutation in the beta-2 integrin gene (ITGB2) causes canine leukocyte adhesion deficiency. *Genomics* 61:101-107, 1999.
- Kijas, J.M.H., Juneja, R.K., Gafvert, S., Andersson, L.: Detection of the causal mutation for canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) using pyrosequencing. *Animal Genetics* 31:326-328, 2000.
- Lin, L., Faraco, J., Li, R., Kadotani, H., Rogers, W., Lin, X.Y., Qiu, X.H., de Jong, P.J., Nishino, S., Mignot, E.: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365-376, 1999.
- Lingaas, F., Comstock, K.E., Kirkness, E.F., Sørensen, A., Aarskaug, T., Hitte, C., Nickerson, M.L., Moe, L., Schmidt, L.S., Thomas, R., Breen, M., Galibert, F., Zbar, B., Ostrander, E.A.: A mutation in the canine BHD gene is associated with hereditary multifocal renal cystadenocarcinoma and nodular dermatofibrosis in the German Shepherd dog. *Hum Mol Genet* 12:3043-53, 2003.
- Lowe, JK., Kukekova, AV., Kirkness, EF., Langlois, MC., Aguirre, GD., Acland, GM., Ostrander, EA.: Linkage mapping of the primary disease locus for collie eye anomaly. *Genomics* 82:86-95, 2003.
- Maurer, M., Mary, J., Guillaud, L., Fender, M., Pelé, M., Bilzer, T., Olby, N., Penderis, J., Shelton, G.D., Panthier, J.J., Thibaud, J.L., Barthélémy, I., Aubin-Houzelstein, G., Blot, S., Hitte, C., Tiret, L.:

Centronuclear myopathy in Labrador retrievers: a recent founder mutation in the PTPLA gene has rapidly disseminated worldwide. *PLoS One* 7:e46408, 2012.

Mealey, K.L., Bentjen, S.A., Gay, J.M., Cantor, G.H.: Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 11:727-33, 2001.

Mealey, K.L., Munyard, K.A., Bentjen, S.A.: Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Vet Parasitol* 131:193-6, 2005.

Mealey, K.L., Meurs, K.M.: Breed distribution of the ABCB1-1Delta (multidrug sensitivity) polymorphism among dogs undergoing ABCB1 genotyping. *J Am Vet Med Assoc* 233:921-4, 2008.

Mellersh, C.S., Pettitt, L., Forman, O.P., Vaudin, M., Barnett, K.C.: Identification of mutations in HSF4 in dogs of three different breeds with hereditary cataracts. *Vet Ophthalmol* 9:369-78, 2006.

Mellersh, C.S., McLaughlin, B., Ahonen, S., Pettitt, L., Lohi, H., Barnett, K.C.: Mutation in HSF4 is associated with hereditary cataract in the Australian Shepherd. *Vet Ophthalmol* 12:372-8, 2009.

Melville, S.A., Wilson, C.L., Chiang, C.S., Studdert, V.P., Lingaas, F., Wilton, A.N.: A mutation in canine CLN5 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Border collie dogs. *Genomics* 86:287-94, 2005.

Meurs, K.M., Mauceli, E., Lahmers, S., Acland, G.M., White, S.N., Lindblad-Toh, K.: Genome-wide association identifies a deletion in the 3' untranslated region of Striatin in a canine model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Hum Genet* 128:315-24, 2010.

Meurs, K.M., Stern, J.A., Sisson, D.D., Kittleson, M.D., Cunningham, S.M., Ames, M.K., Atkins, C.E., Defrancesco, T., Hodge, T.E., Keene, B.W., Reina Doreste, Y., Leuthy, M., Motsinger-Reif, A.A., Tou, S.P.: Association of Dilated Cardiomyopathy with the Striatin Mutation Genotype in Boxer Dogs. *J Vet Intern Med* 27:1437-1440, 2013.

Minor, K.M., Patterson, E.E., Keating, M.K., Gross, S.D., Ekenstedt, K.J., Taylor, S.M., Mickelson, J.R.: Presence and impact of the exercise-induced collapse associated DNMI mutation in Labrador retrievers and other breeds. *Vet J* 189:214-219, 2011.

Mizukami, K., Kawamichi, T., Koie, H., Tamura, S., Matsunaga, S., Imamoto, S., Saito, M., Hasegawa, D., Matsuki, N., Tamahara, S., Sato, S., Yabuki, A., Chang, H.S., Yamato, O.: Novel rapid genotyping assays for neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs and high frequency of the mutant allele in Japan. *J Vet Diagn Invest* 23:1131-9, 2011.

Mizukami, K., Kawamichi, T., Koie, H., Tamura, S., Matsunaga, S., Imamoto, S., Saito, M., Hasegawa, D., Matsuki, N., Tamahara, S., Sato, S., Yabuki, A., Chang, H.S., Yamato, O.: Neuronal ceroid lipofuscinosis in Border Collie dogs in Japan: clinical and molecular epidemiological study (2000-2011). *Scientific World Journal* 2012:383174, 2012a.

Mizukami, K., Chang, H.S., Yabuki, A., Kawamichi, T., Hossain, M.A., Rahman, M.M., Uddin, M.M., Yamato, O.: Rapid genotyping assays for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1

gene and low frequency of the mutant allele in Border Collie dogs. *J Vet Diagn Invest* 24:127-34, 2012b.

Neff, M.W., Robertson, K.R., Wong, A.K., Safra, N., Broman, K.W., Slatkin, M., Mealey, K.L., Pedersen, N.C.: Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11725-30, 2004.

Owczarek-Lipska, M., Jagannathan, V., Drögemüller, C., Lutz, S., Glanemann, B., Leeb, T., Kook, P.H.: A Frameshift Mutation in the Cubilin Gene (CUBN) in Border Collies with Imerslund-Gräsbeck Syndrome (Selective Cobalamin Malabsorption). *PLoS One* 8:e61144, 2013.

Parker, H.G., Kukekova, A.V., Akey, D.T., Goldstein, O., Kirkness, E.F., Baysac, K.C., Mosher, D.S., Aguirre, G.D., Acland, G.M., Ostrander, E.A.: Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res* 17:1562-71, 2007.

Patterson, E.E., Minor, K.M., Tchernatynskaia, A.V., Taylor, S.M., Shelton, G.D., Ekenstedt, K.J., Mickelson, J.R.: A canine DNMT1 mutation is highly associated with the syndrome of exercise-induced collapse. *Nat Genet* 40:1235-9, 2008.

Pelé, M., Tired, L., Kessler, J.L., Blot, S., Panthier, J.J.: SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum Mol Genet* 14:1417-27, 2005.

Pfeiffer, I., Brenig, B.: Frequency of the canine leucocyte adhesion deficiency (CLAD) mutation among Irish red setters in Germany. *J Anim Breed Genet* 122:140-2, 2005.

Ray, J., Bouvet, A., Desanto, C., Fyfe, J.C., Xu, D.B., Wolfe, J.H., Aguirre, G.D., Patterson, D.F., Haskins, M.E., Henthorn, P.S.: Cloning of the canine beta-glucuronidase cDNA, mutation identification in canine MPS VII, and retroviral vector-mediated correction of MPS VII cells. *Genomics* 48:248-253, 1998.

Owczarek-Lipska, M., Thomas, A., André, C., Hölzer, S., Leeb, T.: Frequency of gene defects in selected European retriever populations. *Schweiz Arch Tierheilkd* 153:418-20, 2011.

Sharp, N.J.H., Kornegay, J.N., Vancamp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., Roses, A.D., Bartlett, R.J.: An Error in Dystrophin Messenger RNA Processing in Golden Retriever Muscular Dystrophy, an Animal Homologue of Duchenne Muscular Dystrophy. *Genomics* 13:115-121, 1992.

Suber, M.L., Pittler, S.J., Qin, N., Wright, G.C., Holcombe, V., Lee, R.H., Craft, C.M., Lolley, R.N., Baehr, W., Hurwitz, R.L.: Irish Setter Dogs Affected with Rod/Cone Dysplasia Contain a Nonsense Mutation in the Rod cGMP Phosphodiesterase beta- Subunit Gene. *PNAS* 90:3968-3972, 1993.

Tappin, S.W., Goodfellow, M.R., Peters, I.R., Day, M.J., Hall, E.J., Mealey, K.L.: Frequency of the mutant MDR1 allele in dogs in the UK. *Vet Rec* 171:72, 2012.

Tsai, K.L., Noorai, R.E., Starr-Moss, A.N., Quignon, P., Rinz, C.J., Ostrander, E.A., Steiner, J.M., Murphy, K.E., Clark, L.A.: Genome-wide association studies for multiple diseases of the German Shepherd Dog. *Mamm Genome* 23:203-11, 2012.

Walmsley, G.L., Arechavala-Gomez, V., Fernandez-Fuente, M., Burke, M.M., Nagel, N., Holder, A., Stanley, R., Chandler, K., Marks, S.L., Muntoni, F., Shelton, G.D., Piercy, R.J.: A duchenne muscular dystrophy gene hot spot mutation in dystrophin-deficient cavalier king charles spaniels is amenable to exon 51 skipping. *PLoS One* 5:e8647, 2010.

Walser-Reinhardt, L., Hässig, M., Spiess, B.: Collie Eye Anomaly in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 151:597-603, 2009.

Winand, N.J.: Molecular genetic characterization of spontaneously occurring animal models of Duchenne muscular dystrophy. PhD dissertation, chapter 4, 1994.

Zangerl, B., Goldstein, O., Philp, A.R., Lindauer, S.J., Pearce-Kelling, S.E., Mullins, R.F., Graphodatsky, A.S., Ripoll, D., Felix, J.S., Stone, E.M., Acland, G.M., Aguirre, G.D.: Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 88: 551-63, 2006.