

FLATCOATED RETRIEVER TUMORPROJECT

verzamelen en opslaan monsters van Flatcoated retrievers met kanker

Maurice Zandvliet - UU Kankercentrum voor Dieren

Kanker bij de Flatcoated Retriever

De Flatcoated Retriever wordt in meerdere studies uit zowel het Verenigd Koninkrijk als Nederland aangemerkt als een ras met een verhoogd risico op het ontwikkelen van kanker. In deze studies wordt vooral het Histiocytair Sarcoom/Maligne Histiocytose (HS/MH) benoemd, maar daarnaast worden ook andere vormen van kanker als lymfeklierkanker en botkanker gerapporteerd. Het frequent voorkomen van deze kwaadaardige tumoren, drukt niet alleen een duidelijke stempel op de gezondheidsstatus van het ras, maar ook op de levensverwachting van de individuele hond en het ras als geheel.

Genetische gevoeligheid bij een ras

Door het onevenredig veel voorkomen van deze specifieke tumortypes, is er sprake van een toegenomen gevoeligheid bij het ras. Deze verhoogde gevoeligheid geeft een sterke verdenking op een onderliggende genetische, en daarmee mogelijk ook erfelijke, component voor deze vormen van kanker.

De genetische achtergrond van kanker is meer gecompliceerd dan de relatief eenvoudige erfelijke achtergrond bij eigenschappen als vachtkleur of sommige erfelijke oogaandoeningen. Bij deze *simpele* erfelijke aandoeningen zijn in de regel slechts één of soms hoogstens enkele genen betrokken. Kanker geldt als een zogenaamde *complexe aandoening*. Naast een genetisch component (de aanleg), is er ook een niet-genetische component (omgevingsfactoren) vereist. Dit maakt dat de kans op het vinden van één enkele gendefect (*mutatie*) die voor kanker zorgt klein is. Echter, er kan vaak wel een relatie (*associatie*) met één of meerdere genen worden gelegd. Het kunnen onderkennen en/of voorspellen van de genetische gevoeligheid van een individueel dier is van essentieel belang bij het ondersteunen van een fokbeleid gericht op het uitselecteren van deze verhoogde gevoeligheid. Daarom is het van belang om een DNA-test te ontwikkelen waarmee uiteindelijk een risico-inschatting gemaakt kan worden voor een individueel dier of een combinatie van dieren.

Genetisch onderzoek t.b.v. een DNA test

Om een DNA-test te ontwikkelen is onderzoek nodig. Bij dit type onderzoek, de zogenaamde genome-wide-association studies, wordt er een vergelijking gemaakt tussen het erfelijk materiaal (*DNA*) van dieren met de specifieke aandoening van interesse, de zogenaamde "*lijders*", en *gezonde controledieren*. Het is voor dit type onderzoek van essentieel belang dat alleen dieren worden gebruikt waarbij 100% zekerheid bestaat of zij *lijder* of *gezond* zijn. Als er bij de analyse dieren zonder de specifieke ziekte in de categorie lijders wordt ingedeeld of soms zelfs per ongeluk in de categorie gezonde dieren, kan dit grote gevolgen hebben. Het kan ertoe leiden dat er geen of misschien zelfs de verkeerde *associatie* wordt gevonden.

Wel of geen ziekte?

Het in de verkeerde categorie ingedeeld worden lijkt misschien onwaarschijnlijk, maar komt makkelijker voor dan in eerste instantie gedacht. Het meest bekend voorbeeld is dat de diagnose niet zeker is. Een voorbeeld hiervan is als een dierenarts bij een oudere hond met vage klachten aangeeft dat gezien de leeftijd en het ras het zeer waarschijnlijk is dat de hond kanker heeft. Gezien deze meest waarschijnlijke diagnose wordt er geen verder onderzoek meer ingesteld en de hond wordt ingeslapen. Of er wordt wel onderzoek gedaan, bijvoorbeeld een röntgenfoto, waar een uitzaaiing op zichtbaar is, maar er geen verder onderzoek naar het specifieke soort kanker volgt. Het DNA van deze hond is in beide gevallen niet geschikt voor verder genetisch onderzoek. In het eerste geval is er geen diagnose, maar spraken van een zogenaamde waarschijnlijkheidsdiagnose en die helemaal niet hoeft te kloppen. In het tweede geval is er weliswaar een zeer grote waarschijnlijkheid op de diagnose kanker, maar het missen van een specifieke kanker-diagnose maakt dat ook dit monster niet bruikbaar is.

Het per ongeluk indelen van honden in de groep met gezonde controledieren is een probleem dat specifiek bij onderzoek naar kanker speelt. Dit omdat kanker in de regel op oudere leeftijd ontstaat. Als een hond op zesjarige leeftijd komt te overlijden aan de gevolgen van een auto-ongeluk of nierfalen, dan is de directe doodsoorzaak duidelijk niet het gevolg van kanker. Maar het is wel mogelijk dat als de hond niet was aangereden of geen nierlijden had ontwikkeld en nog langer geleefd zou hebben, er op een later moment in het leven alsnog kanker zou zijn ontstaan. Om deze reden moeten controledieren bij kanker een minimale leeftijd hebben bereikt.

De betekenis van ‘gezond’

Een tweetal kanttekeningen is hier op zijn plaats. “Gezond” betekent dus nadrukkelijk *niet* dat een hond niet ziek mag zijn of zijn geweest om als controle te kunnen dienen. Een “gezonde” controle is dus een dier dat niet de specifieke aandoening heeft waar vanuit het onderzoek interesse in is, in dit geval kanker. Daarnaast kunnen oudere dieren zogenaamde *spontane* (dat wil zeggen niet-erfelijke) vormen van kanker ontwikkelen. Het is dan ook goed om te realiseren dat niet elke vorm van kanker een ouder dier per definitie diskwalificeert om als “gezond” controledier te kunnen dienen. Of het desbetreffende dier met een specifieke vorm van kanker nog wel of niet als gezonde controle kan fungeren is aan de inschatting van de oncoloog.

Voorwaarde voor betrouwbaar genetisch onderzoek – een database

Samengevat, om onderzoek gericht op het ontwikkelen van een DNA-test mogelijk te maken is het een absolute voorwaarde om een gegarandeerde koppeling bestaat tussen een nauwkeurige en 100% zekere diagnose en het erfelijk materiaal van het desbetreffende individuele dier. Verder moeten er ook erfelijk materiaal van een voldoende groot aantal gezonde controledieren beschikbaar zijn. En tenslotte is de opslag en zekerstelling van al deze gegevens en het DNA-materiaal voor de toekomst noodzakelijk.

Het mogelijk maken van relevant, betrouwbaar genetisch onderzoek naar HS bij de Flatcoated Retriever is dan ook onlosmakelijk verbonden is met het opzetten van een goede verzameling gegevens of *database*.

Hoe ziet de opzet van een database eruit?

In de voorgestelde database moeten alle individuele dieren ondubbelzinnig geïdentificeerd en geregistreerd kunnen worden. Gelukkig is in Nederland mogelijk doordat alle honden verplicht gechipt moeten worden en daarmee zijn zij, letterlijk en figuurlijk, een uniek individu geworden. Daarnaast is de opslag van DNA-materiaal in de database van het Expertise Centrum Genetica, faculteit Diergeneeskunde, vanaf dit moment al mogelijk en zal dit materiaal beschikbaar blijven voor onderzoek zowel nu als in de toekomst.

Stamboomgegevens

Belangrijk om aan te geven dat de voorkeur gaat uitgaat naar het opslaan in combinatie met de stamboomgegevens (indien beschikbaar). Door het opslaan van DNA blijft het genetisch profiel van de hond (het *genotype*) beschikbaar voor onderzoek naar alle andere genetische aandoeningen waar nu of in de toekomst interesse voor is.

Een zekere, specifieke diagnose

Daarnaast moet bij een dier dat verdacht wordt op kanker (*de lijder*) een zekere en specifieke diagnose gesteld worden voordat de gegevens ingevoerd kunnen worden in de database. Diagnoses als “het zal wel kanker zijn” of “kanker” zijn - zoals hierboven ook al uitgelegd - onvoldoende. Voor het laten slagen van een genetisch project is van essentieel belang dat er een specifieke kankerdiagnose (het zogenaamde *phenotype*) wordt gesteld. Dat moeten dan diagnoses zijn als bijvoorbeeld HS/MH, maligne lymfoom (lymfeklierkanker) of osteosarcoom (botkanker) etc. Soms kan zo’n diagnose relatief eenvoudig worden gesteld met een zogenaamd

celbiopt. Dit kan in de regel bij het wakkere dier (dus zonder narcose) worden afgenomen. Het is daarmee een relatief snel onderzoek, relatief goedkoop en weinig belastend voor de hond. Helaas geeft het niet altijd de gewenste zekerheid.

Bij twijfel nader onderzoek

Bij onvoldoende zekerheid over de diagnose is de volgende stap om een groter monster, een zogenaamd weefselbiopt, te nemen. Een dergelijk biopt wordt afhankelijk van de locatie van de tumor, onder een lokale of algehele narcose afgenomen. Het weefselbiopt wordt dan ingestuurd naar een patholoog voor histologisch onderzoek. In de regel is dit onderzoek afdoende, maar soms is er dan nog heel specifiek aanvullend onderzoek, een zogenaamde immunohistochemische kleuring, op dit al afgenomen monster nodig. Een immunohistochemische kleuring is zo gekozen dat deze de aanwezigheid van een bepaald type tumor bevestigt. Dat betekent dat het de vraag beantwoordt is dit wel of niet HS/MH? Als het ja is zijn we klaar, maar als de kleuring negatief is geeft het dus nog steeds geen diagnose anders dan dat het geen HS/MH is. Voor het aantonen of uitsluiten van andere type tumoren zijn dan weer andere immunohistochemische kleuringen noodzakelijk. Het weefselbiopt geeft dus de grootste zekerheid over de diagnose, maar is meer belastend voor het dier en door de extra stappen ook relatief prijzig in vergelijking met het celbiopt.

De gezonde veteraan

Om als een gezond dier te kunnen dienen moet een hond minimaal 10 jaar oud zijn geworden (*de gezonde veteraan*), niet zijn overleden aan de gevolgen van kanker en het liefst nooit kanker hebben gehad. Mocht er in het verleden wel kanker hebben gespeeld dan moet dit in elk geval een vorm van kanker zijn die zeer waarschijnlijk niet erfelijk is, idealiter goedaardig was en de hond moet na de diagnose nog lang tijd in goede gezondheid hebben geleefd. Voorbeelden hiervan zijn onder andere het histiocytoom en allerlei vormen van goedaardige huidtumoren als talg- of zweetkliertumoren en perianaalkliertumoren. Dit zijn slechts enkele voorbeelden en er zijn nog meerdere tumortypes denkbaar die geen uitsluiting hoeven te betekenen. Om deze beslissing over uitsluiting als controledier goed onderbouwd te kunnen nemen is het dringend advies om juist ook bij deze groep oudere honden de tumoren goed te laten onderzoeken zodat er de juiste beslissingen kunnen worden genomen over hun verdere bijdrage aan het onderzoek.

Ons voorstel

Om tot zo veel en efficiënt mogelijk waardevolle gegevens te komen stellen wij het volgende voor:

Informatievoorziening richting eigenaren vanuit rasverenigingen/Stichting FICAA

1. Eigenaren het belang en nut omtrent DNA-opslag van hun (jonge) FR te laten inzien en te stimuleren het DNA te laten opslaan, zeker voor de honden die ingezet zijn/gaan worden voor de fok.
 - Bloedafname voor DNA-opslag kan worden gecombineerd als er om een andere reden bloedafname noodzakelijk is. Bijvoorbeeld bij een bloedafname voor een gezondheidscontrole of fokbegeleiding.
 - DNA-opslag op jonge leeftijd is niet te vroeg. Mochten dieren op latere leeftijd kanker ontwikkelen, kan deze informatie op elke willekeurig moment gekoppeld worden aan het al aanwezige DNA-monster.
2. Het belang om van elke vorm van kwaadaardige kanker de juiste diagnose te krijgen. Ook al helpt deze kennis mogelijk niet de individuele hond, deze informatie is wel van het grootste belang voor het ras als geheel. Vanuit het fokbeleid zijn op dit moment vooral het Histiocytair Sarcoom/Maligne Histiocytose (MS/MH), lymfeklierkanker (maligne lymfoom) en botkanker van belang.
3. Dieren die ouder zijn dan 10 jaar en overlijden aan een andere oorzaak dan kanker en geen (erfelijke) tumoren gedurende hun leven hebben ontwikkeld zijn van zeer groot belang als controledieren. Het verzamelen en opslaan van DNA van deze dieren heeft een hoge prioriteit.

4. Belangrijk om te vermelden: de kosten voor het in beeld brengen van kanker bij de FR zijn potentieel groot en het budget niet oneindig.

Om een idee te geven zijn hier enkele kosten (peildatum 1.1.2021) benoemd:

- Het isoleren en opslaan van DNA uit bloed kost €22,50 (dit is exclusief kosten voor bloedafname),
- Het opslaan van een tumormonster kost €22,50,
- Een immunohistochemische kleuring kost € 39,99 *excl.* BTW (dit is exclusief kosten voor biopsname en routine weefselonderzoek).
- Tijd van de betrokken oncologen. Deze component is van tevoren het meest lastig om in te schatten. Het werk voor het FR-project komt boven op de reguliere werkzaamheden van de afdeling Oncologie en zal niet gedragen worden door de werkgever, het departement Clinical Sciences. Er zal een redelijke vergoeding gerekend moeten worden (deze zal in overleg met het managementteam van het departement Clinical Sciences worden vastgesteld in de loop van het project) en de gedeclareerde tijd zal inzichtelijk gemaakt worden naar de beheerders van het project.

Tenslotte, Flatcoated Retrievers die naar de Universiteitskliniek voor Gezelschapsdieren komen, worden ingelicht van het belang van dit project en uitgenodigd om deel te nemen.

Flatcoated retriever tumorproject

Informatie voor eigenaren t.b.v. het opsturen van monsters

Verzamelen en opslaan monsters van Flatcoated retrievers met kanker

Wat is het doel?

Registreren van tumordiagnoses en bij de Flatcoated retriever en het opslaan van DNA. Daarnaast is het mogelijk om tumormateriaal van honden met maligne lymfoom (lymfeklierkanker), histiocytair sarcoom/maligne histiocytose of botkanker op te slaan.

Met het systematisch verzamelen en opslaan van deze gegevens en monsters wordt onderzoek naar deze tumoren en hun erfelijke achtergrond mogelijk gemaakt.

Wat is er nodig?

Van elke **Flatcoated retriever met kanker** is er nodig:

1. Stamboom
2. Specifieke en zekere tumordiagnose (b.v. kopie van uitslag cel- of weefselonderzoek of sectie)
3. DNA-materiaal (als niet al aanwezig)
 - 4 ml EDTA-bloed geeft de beste kans op goede DNA-isolatie
 - Liever geen (mond)swabs
 - Indien al DNA-monster aanwezig bij databank graag melding van maken!
4. Akkoordverklaring opslag gegevens ten behoeve van Flatcoated retriever-tumorproject
5. Idealiter wordt er ook nog meer tumormateriaal verzameld
 - Voor onderzoek is tumormateriaal zeer belangrijk. Er zijn 2 manieren om materiaal te verkrijgen wat geschikt is voor verder onderzoek:
 - Vers tumorweefsel invriezen in -80°C (vloeibaar stikstof)
Dit is praktisch gezien alleen mogelijk als euthanasie plaatsvindt op een plek waar vloeibaar stikstof aanwezig is en er zo spoedig mogelijk (minimaal binnen 15-30') na euthanasie een tumormonster kan worden afgenomen.
 - Tumormateriaal bewaren in RNA-later en deze na 1-2 dagen invriezen.
Bij geplande euthanasie (en voldoende tijd) is optie 2 het meest praktisch. Er kan dan een pakketje met een EDTA-bloedbuisje (DNA) en buisje met RNA-later (tumormonster) worden opgestuurd.

Van elke **gezonde veteraan** (FR zonder kanker en ouder dan 10 jaar):

1. Stamboom
2. DNA-materiaal (als niet al aanwezig)
 - 4 ml EDTA-bloed geeft de beste kans op goede DNA-isolatie
 - Liever geen (mond)swabs

Let op: Als een hond in veteranenbestand zit, vergeet dan niet bij het flatcoated retriever-tumorteam te melden dat de hond overleden is en waaraan!

Welke honden komen in aanmerking?

Flatcoated Retrievers die voor diagnose en/of behandeling worden aangeboden bij de Universiteitskliniek voor Gezelschapsdieren zullen, indien geschikt, meegenomen worden in dit project.

Maar uiteraard kunnen ook monsters die elders zijn verkregen worden opgenomen in de database. Hiervoor is het van belang dan de gegevens zoals vermeld onder "Wat is er nodig" meegestuurd worden.

Eigenaren die hieraan mee willen werken, worden verzocht om in eerste instantie contact op te nemen met het UU KankerCentrum voor Dieren van de Universiteitskliniek voor Gezelschapsdieren.

Dit om te voorkomen dat monsters of gegevens verstuurd worden zonder dat het oncologie team hiervan op de hoogte is, en de gegevens vervolgens niet goed verwerkt worden.

Bij bellen adviseren gebruik te maken van nummer

030-2549411

Bij mailen adviseren we gebruik te maken van mailadres

receptieUKG@uu.nl

T.a.v. Flatcoated Retriever tumorproject

Bij mail of telefonisch contact nadrukkelijk vermelden dat het om een vraag voor het FR-tumor project gaat. De receptie zorgt voor contact met de juiste personen. (Noot: Het oncologie team bestaat uit meerdere personen en deze nemen met elkaar de verantwoordelijkheid voor dit project. Dit zijn werkzaamheden die plaatsvinden naast het reguliere werk en dat betekent dat er soms 2-3 werkdagen overheen gaan voor er contact is.)

Wat zijn de kosten die wij declareren bij FR-tumorproject*?

- Bij onvoldoende duidelijkheid over de aard van de tumor faciliteren wij een aanvullend onderzoek naar de exacte diagnose. Afhankelijk van de verdenking en noodzaak tot aanvullende kleuringen berekenen wij per kleuring. Ter indicatie kleuringen kosten € 39,99 *excl.* BTW. Indien het een patiënt van de Universiteitskliniek betreft, zullen deze kosten normaliter gedragen worden door de eigenaar.
- Per tumormonster declareren wij €22,50 om het monster te registreren en op te slaan in een gecontroleerde vriezer.
- Per DNA-monster declareren wij €22,50 om het monster te registreren, DNA te isoleren en het DNA op te slaan voor toekomstig onderzoek.
- Voor het bevestigen van de diagnose en het registreren van de gegevens in de database hanteren we een non-profit uurtarief van €150. * Kosten peildatum 1.1.2021

Hoe meer onderzoeken de eigenaar zelf betaalt, hoe meer monsters wij kunnen opslaan en zo gaan we

samen op weg naar een **gezondere Flatcoated retriever** zonder kanker!!