

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Salute Animale

Ciclo XXIV

Caratterizzazione clinica, neurofisiologica e di laboratorio
dei cani affetti da poliradicoloneurite acuta

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Cavarani Sandro

Tutor:
Chiar.mo Prof. Martelli Paolo

Dottorando: Dott. Melis Gabriele Costantino

INDICE

Abstract.....	pag 3
Cap 1: Introduzione.....	pag 4
1.1: Sistema Nervoso Periferico.....	pag 5
1.2: Malattie Neuromuscolari.....	pag 14
1.3: Poliradicoloneurite acuta del cane.....	pag 27
Cap 2: Materiali e Metodi.....	pag 35
2.1: Sottotipizzazione neurofisiologica.....	pag 36
2.2: Presenza di autoanticorpi antigangliosidi.....	pag 39
Cap 3: Risultati.....	pag 41
Cap 4: Discussione e Conclusioni.....	pag 47

ABSTRACT

Acute Canine Polyradiculoneuritis (ACP) is a peripheral neuropathy suspected to be caused by an immune-mediated attack against nerve roots and peripheral nerves.

The objects of this study were: 1) to evaluate retrospectively the electrodiagnostic studies of dogs with ACP and to classify them in subtypes using neurophysiological criteria similar to those used in Guillain-Barré Syndrome (GBS); 2) to assess a potential correlation between ACP subtypes and the presence of anti-gangliosides autoantibodies. The electrodiagnostic studies were performed in the animals referred to our faculty between 2007 and 2011 in the light of neurophysiological criteria adopted in GBS. Through an accurate electrodiagnostic evaluation (EMG, repetitive nerve stimulation, nerve conduction studies, F waves and sensory evaluation in at least 1 ulnar nerve and 1 tibial nerve), we obtained a classification in 3 major subtypes: demyelinating forms (AIDP), motor axonal forms (AMAN), and motor and sensory axonal forms (AMSAN).

The second step was to take samples of blood from 29 subjects affected by ACP. The sera were tested for the presence of anti-gangliosides autoantibody at the laboratory of human medicine “Glasgow Biomedical Research Centre”. The results showed a major percentage of demyelinating forms of ACP (40%) compared to motor axonal forms (30%) and sensory and axonal forms (27%).

Serological investigation show a 30% of positivity to anti-gangliosides antibodies.

1

INTRODUZIONE

1.1

SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Il termine Sistema Nervoso Periferico (SNP) comprende il sistema neuromuscolare, il sistema nervoso sensitivo e il sistema nervoso autonomo (1).

Il SNP è costituito dai nervi cranici, dai nervi spinali e dai gangli loro annessi (2); non costituendo un'unità funzionale autonoma, il SNP deve sempre rapportarsi, direttamente o indirettamente, al Sistema Nervoso Centrale (SNC) conducendo ad esso gli stimoli provenienti dagli organi recettori (componente afferente sensitiva) e trasmettendo agli organi effettori (componente efferente motoria) le risposte così ottenute (3).

Va oltre lo scopo di questa tesi trattare la componente autonoma del SNP, si farà quindi esclusivo riferimento alla componente somatica generale.

Sistema Nervoso Sensitivo

La componente del sistema nervoso sensitivo a cui si fa riferimento, il sistema somatico afferente generale (SAG), è costituita da fibre afferenti che conducono al midollo spinale gli stimoli eccitativi provenienti dal tegumento e da parti più profonde del corpo quali muscoli, tendini, legamenti, articolazioni, ossa (4).

Le fibre afferenti sensitive rappresentano il prolungamento neuritico periferico di neuroni a T il cui corpo cellulare è contenuto nei gangli spinali (4); i gangli spinali segmentali sono situati lungo il decorso della radice dorsale e la loro dimensione varia in relazione al numero di fibre afferenti che vi arrivano (3).

I neuroni pseudounipolari, unità funzionale del SAG, presentano una zona dendritica modificata a formare dei recettori che possono essere capsulati o non capsulati; di questi recettori fanno parte gli esterocettori (di cui i meccanocettori e i nocicettori sono quelli di nostro interesse), attivati dal contatto con l'ambiente esterno e i recettori per la propriocezione generale, sensibili al movimento e localizzati a livello di muscoli, tendini e articolazioni. Lo stimolo così percepito alla periferia corre lungo l'assone attraverso il nervo periferico, il nervo spinale e le radici dorsali, entrando nel midollo spinale attraverso il solco dorsolaterale. Una volta all'interno del midollo spinale gli assoni SAG ascendono o discendono per diversi segmenti midollari prima di contrarre sinapsi, direttamente o indirettamente (attraverso l'interposizione di un interneurone) con il motoneurone inferiore (MNI) in modo da completare l'arco riflesso (5).

Gli assoni SAG che trasportano informazioni dolorifiche sinaptano invece con neuroni che proiettano l'informazione alla corteccia cerebrale somatosensoriale attraverso i tratti spinothalamici che decorrono bilateralmente nel midollo spinale (5).

Per quanto riguarda la propriocezione generale (PG) alcuni assoni sinaptano direttamente o indirettamente con il MNI, altri trasferiscono informazioni di propriocezione conscia alla corteccia cerebrale somatosensoriale controlaterale, altri ancora trasferiscono informazioni sulla propriocezione inconscia ascendendo bilateralmente al cervelletto (5).

Sistema Nervoso Motorio

Il sistema neuromuscolare è composto da unità motorie: gruppi di miofibre innervate da un singolo neurone. L'unità motoria è composta da un corpo neuronale con il suo assone (motoneurone inferiore MNI), dalla giunzione neuromuscolare e dalle fibre muscolari innervate (6).

Il motoneurone inferiore (MNI) appartiene al sistema Somatico Efferente Generale (SEG) e rappresenta il neurone motorio del sistema neuromuscolare. Il MNI che a noi interessa trattare comprende i neuroni che innervano i muscoli striati derivanti dai somiti, dal mesoderma somatico, dai somitomeri della testa e dalle gemme degli arti (6).

I corpi cellulari dei MNI dei nervi spinali sono disposti lungo tutto il midollo spinale a livello della colonna grigia ventrale che, in base al volume di muscoli striati innervati, varia in forma e dimensioni; i neuroni SEG deputati all'innervazione dei muscoli assiali sono localizzati nella parte mediana della colonna grigia, mentre i neuroni che innervano i muscoli appendicolari sono disposti lateralmente, determinando i rigonfiamenti laterali della colonna grigia ventrale corrispondenti alle intumescenze brachiale e lombosacrale. I corpi cellulari dei MNI dei nervi cranici sono invece localizzati a livello dei nuclei del tronco encefalico, dal mesencefalo al midollo allungato (6).

La zona dendritica del neurone multipolare è localizzata nella sostanza grigia del midollo spinale adiacente il corpo cellulare. L'assone si porta nella sostanza bianca tra i funicoli laterale e ventrale lasciando il midollo spinale come radicola ventrale, la quale si continua in una radice ventrale e quindi nel nervo spinale formato da quella radice (6). I rami ventrali dei nervi che originano da ciascuna delle due intumescenze si uniscono tra loro originando un intreccio di fibre nervose denominato plesso (7).

Dall'intumescenza cervicale si forma il plesso brachiale dal quale nascono i nervi periferici destinati all'innervazione dell'arto anteriore ossia il nervo soprascapolare, nervo muscolocutaneo, nervo radiale, nervo mediano e nervo ulnare; è da ricordare anche il nervo toracico laterale che innerva i muscoli pellicciai del tronco. Dall'intumescenza lombosacrale si forma il plesso lombosacrale da cui originano i nervi destinati all'arto posteriore, tra cui il nervo femorale e il nervo sciatico, da cui originano il nervo tibiale e il nervo peroneo, rivestono la massima importanza (7).

La porzione di assone intramidollare è mielinizzato dall'oligodendroglia, mentre la porzione localizzata nel SNP è mielinizzata dalle cellule di Schwann (7).

L'assone del MNI decorre quindi nell'arto entrando nella costituzione di uno specifico nervo periferico che va ad innervare, con le sue diramazioni, uno specifico gruppo di muscoli striati (Fig. 1) (1).

La giunzione neuromuscolare, detta anche placca motrice, si compone delle seguenti strutture: il **TERMINALE ASSONALE** in cui sono presenti numerosi mitocondri e vescicole sinaptiche contenenti il neurotrasmettitore acetilcolina (ACh); il **RIPIEGAMENTO SARCOPLASMATICO** della membrana, situato in un'area di membrana muscolare (chiamata suola della placca motoria) ricca di nuclei e mitocondri dove si accumula il sarcoplasma; l'**AVVALLAMENTO SARCOPLASMATICO** che si ripiega in invaginazioni della membrana a formare le pieghe della membrana postsinaptica (fessure subneuruali); la **FESSURA** o **DOCCIA**

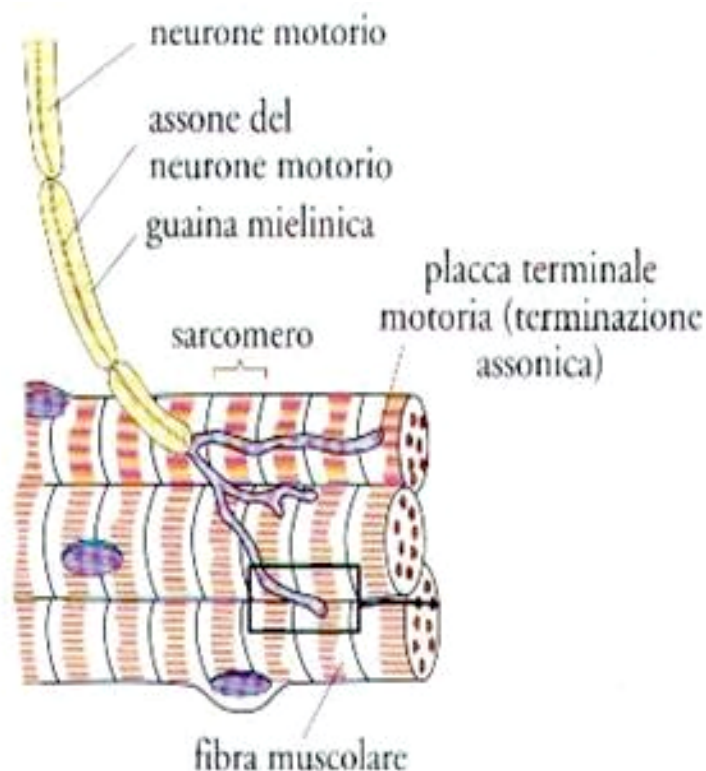


Fig. 1: innervazione del muscolo striato

SINAPTICA, spazio compreso tra la membrana presinaptica (assolemma) e postsinaptica (sarcolemma). Quest'ultima è ricca di recettori per l'acetilcolina, i quali consistono di cinque subunità formate dalle proteine della membrana cellulare, posizionate in cerchio a formare il canale per gli ioni sodio (6).

Ogni neurone SEG, una volta raggiunto il muscolo scheletrico, presenta un terminale assonale coperto da una cellula di Schwann priva di mielina; questo terminale si divide in varie diramazioni che tendono a raggrupparsi in prossimità del centro longitudinale della cellula muscolare e ciascuna branca si estende nell'avvallamento sarcoplasmatico presente sulla superficie del miocita. Al di fuori dell'avvallamento sarcoplasmatico l'endonervio e l'endomysio sono continui, all'interno dell'avvallamento assolemma e sarcolemma sono invece giustapposti (6).

Le miofibre sono singole cellule muscolari multinucleate circondate da una membrana cellulare chiamata sarcolemma; un insieme di miofibre raggruppate assieme è denominato fascicolo muscolare (8).

Ogni miofibrilla contiene numerose centinaia di miofibrille le quali, a loro volta, sono costituite da numerose centinaia di miofilamenti spessi (miosina) e sottili (actina, tropomiosina e tropomiosina) (1).

LA CONTRAZIONE MUSCOLARE

Perché avvenga la contrazione muscolare, un impulso elettrico deve originare nel corpo cellulare del neurone e viaggiare attraverso il nervo fino a raggiungere il terminale presinaptico. La velocità alla

quale il potenziale d'azione viene condotto lungo il nervo dipende dal diametro e dal grado di mielinizzazione del nervo stesso. In genere

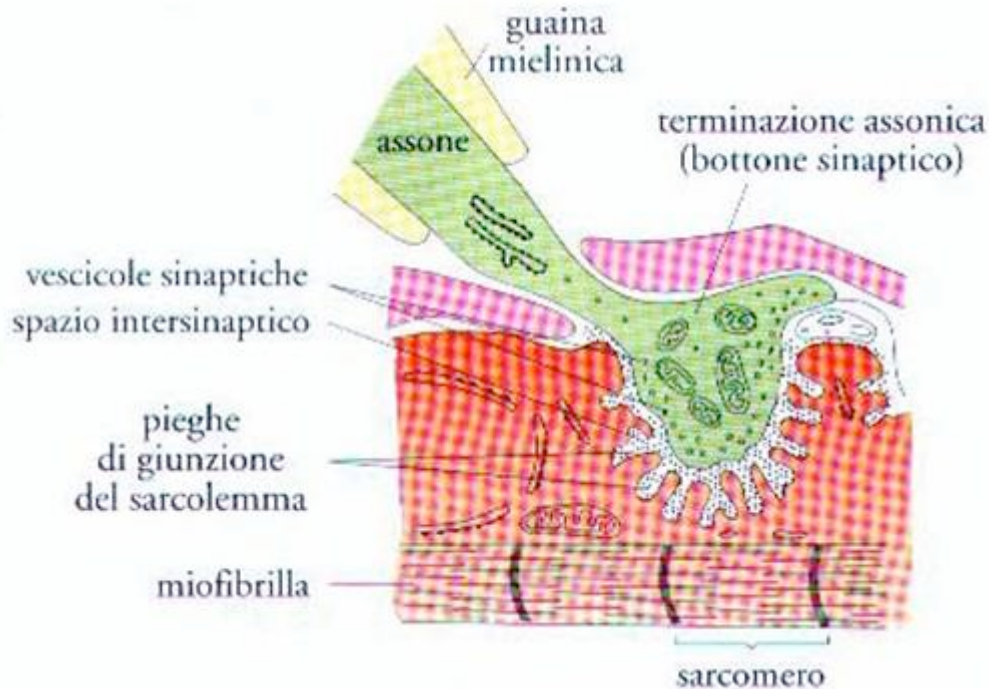


Fig. 2: componenti della placca neuromuscolare

maggiore è il diametro e il grado di mielinizzazione del nervo periferico e più velocemente verrà trasmesso l'impulso (1).

Gli assoni vengono avvolti dalle cellule di Schwann che isolano in questo modo i nervi; le uniche aree non isolate dell'assone sono piccole aree (1 μm) tra una cellula di Schwann e l'altra non rivestite da mielina, denominate nodi di Ranvier. L'impulso viaggia da un nodo di Ranvier all'altro rendendo veloce la conduzione lungo l'assone (conduzione saltatoria) (1).

Quello che avviene successivamente a livello fisiologico è rappresentato da quattro eventi fondamentali: 1) sintesi dell'ACh; 2)

rilascio di ACh dal neurone presinaptico; 3) legame con il recettore e successiva modificazione del potenziale postsinaptico; 4) distruzione enzimatica dell'ACh (8).

L'ACh viene sintetizzata, grazie all'azione dell'enzima colinacetiltransferasi, a partire da acetilcoenzima A e colina; viene successivamente concentrata, mediante un meccanismo di trasporto attivo, all'interno delle vescicole sinaptiche che si accumulano nel terminale presinaptico disponendosi in file ordinate (8).

L'arrivo di un potenziale d'azione nel terminale sinaptico provoca, oltre all'attivazione dei canali per il sodio e per il potassio, normalmente implicati nella generazione dei segnali rapidi nelle fibre nervose, l'apertura transitoria di specifici canali voltaggio-dipendenti per il calcio. L'aumento transitorio della corrente di ioni calcio a livello del terminale presinaptico consente la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana e il conseguente rilascio di pacchetti quantali di ACh; ogni pacchetto contiene circa 10.000 molecole di ACh e ogni depolarizzazione del nervo esita nel rilascio di circa 100 quanti (8).

I recettori per l'ACh (AChR) sono localizzati in un'area ristretta della membrana postsinaptica, in stretta contiguità con la zona in cui il neurotrasmettitore viene rilasciato. Le molecole di ACh formano con i recettori dei legami di brevissima durata che permettono l'apertura dei canali del sodio e un conseguente ingresso degli ioni nella cellula muscolare; questo esita in una depolarizzazione della membrana postsinaptica, chiamato potenziale di placca terminale (8).

In condizioni fisiologiche è presente una notevole quantità di ACh legata agli AChR della membrana postsinaptica; il potenziale di placca terminale è perciò molto superiore rispetto alla soglia di innesco, permettendo la diffusione di un potenziale d'azione attraverso l'intero sarcolemma di ciascuna miofibrilla. Il potenziale d'azione si propaga dalla placca terminale ai tubuli trasversi della miofibrilla provocando il rilascio del calcio, immagazzinato nelle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico, all'interno del sarcoplasma che circonda i miofilamenti; il calcio così rilasciato nel citosol si lega alla troponina modificando la posizione della

tropomiosina rispetto all'actina. Questo permette all'actina e alla miosina di legarsi, generando così la contrazione muscolare (8).

In condizioni fisiologiche le molecole di ACh, dopo aver reagito una sola volta con i AChR, vengono rapidamente inattivate ad opera di un enzima extracellulare: l'acetilcolinesterasi (AChE) che idrolisa l'ACh a colina e acetato (8).

L'AChE è distribuita uniformemente in tutta la porzione introflessa della fessura postsinaptica ed è ben ancorata ad uno strato fibroso di collagene che tappezza la membrana basale (8).

1.2

MALATTIE NEUROMUSCOLARI

Tra le malattie neuromuscolari sono incluse tutte quelle situazioni patologiche in cui viene interessata una qualsiasi componente dell'unità motoria: i corpi cellulari nel SNC, gli assoni e la loro guaina mielinica nelle radici nervose dei nervi cranici e spinali, i nervi cranici e spinali nella loro intera distribuzione periferica, la giunzione neuromuscolare, il muscolo scheletrico striato, i muscoli striati viscerali del faringe, laringe ed esofago che sono innervati dai MNI del SEG (Fig. 3) (6).

Tra le malattie neuromuscolari possiamo quindi riconoscere le neuropatie periferiche nel caso in cui è interessata la componente nervosa (corpi cellulari, assoni o mielina), i disordini di trasmissione neuromuscolare se è interessata l'omeostasi del calcio, l'attività dell'ACh o la funzione dei recettori colinergici postsinaptici oppure le miopatie se ad essere interessata è la componente muscolare (Tabella 1) (9).

L'esame neurologico in corso di neuropatie periferiche è caratterizzato da uno stato del sensorio generalmente normale; tono muscolare ridotto o assente con una paresi/paralisi flaccida legata al coinvolgimento della componente motoria; reazioni posturali generalmente nella norma, a meno di un coinvolgimento della componente sensitiva; riflessi spinali diminuiti o assenti; sensibilità e nocicezione ridotte se presente coinvolgimento della componente sensitiva; i nervi cranici possono essere coinvolti soprattutto nelle neuropatie generalizzate e i nervi più colpiti sono il VII, IX e X (9).

I disordini della giunzione neuromuscolare possono essere suddivisi in disordini presinaptici, postsinaptici e disordini enzimatici. Nei disordini presinaptici, in cui la quantità di ACh rilasciata è ridotta, gli animali presentano dei deficit da MNI con grave ipotonia e iporiflessia; i nervi cranici possono essere coinvolti portando disfagia, disfonia e debolezza facciale (9).

Nei disordini postsinaptici, dovuti ad una interferenza nel meccanismo di attivazione dei AChR, gli animali si presentano con una debolezza scatenata dall'esercizio fisico che tende a migliorare a riposo; l'esame neurologico è normale durante i periodi di normalità che seguono il riposo. Nei disordini enzimatici, in cui molecole chimiche interferiscono con l'acetilcolinesterasi (enzima che inattiva l'ACh nelle sinapsi), i segni clinici si manifestano come iperstimolazione del sistema nervoso autonomo e disordini neuromuscolari spesso simili ai disturbi postsinaptici (rigidità, andatura rigida con tremori muscolari e intolleranza all'esercizio) (9). In corso di miopatie, l'esame neurologico è caratterizzato da uno stato del sensorio normale; andatura rigida con tetraparesi e rigidità/debolezza indotta dall'esercizio fisico; le reazioni posturali possono essere nella norma o alterate se presente grave debolezza; il tono muscolare può essere normale, ridotto o aumentato; ci può essere atrofia o ipertrofia muscolare con un limitato movimento articolare imputabile alle contratture muscolari; i riflessi spinali nella norma (a meno che non sia presente atrofia o fibrosi muscolare); i riflessi dei

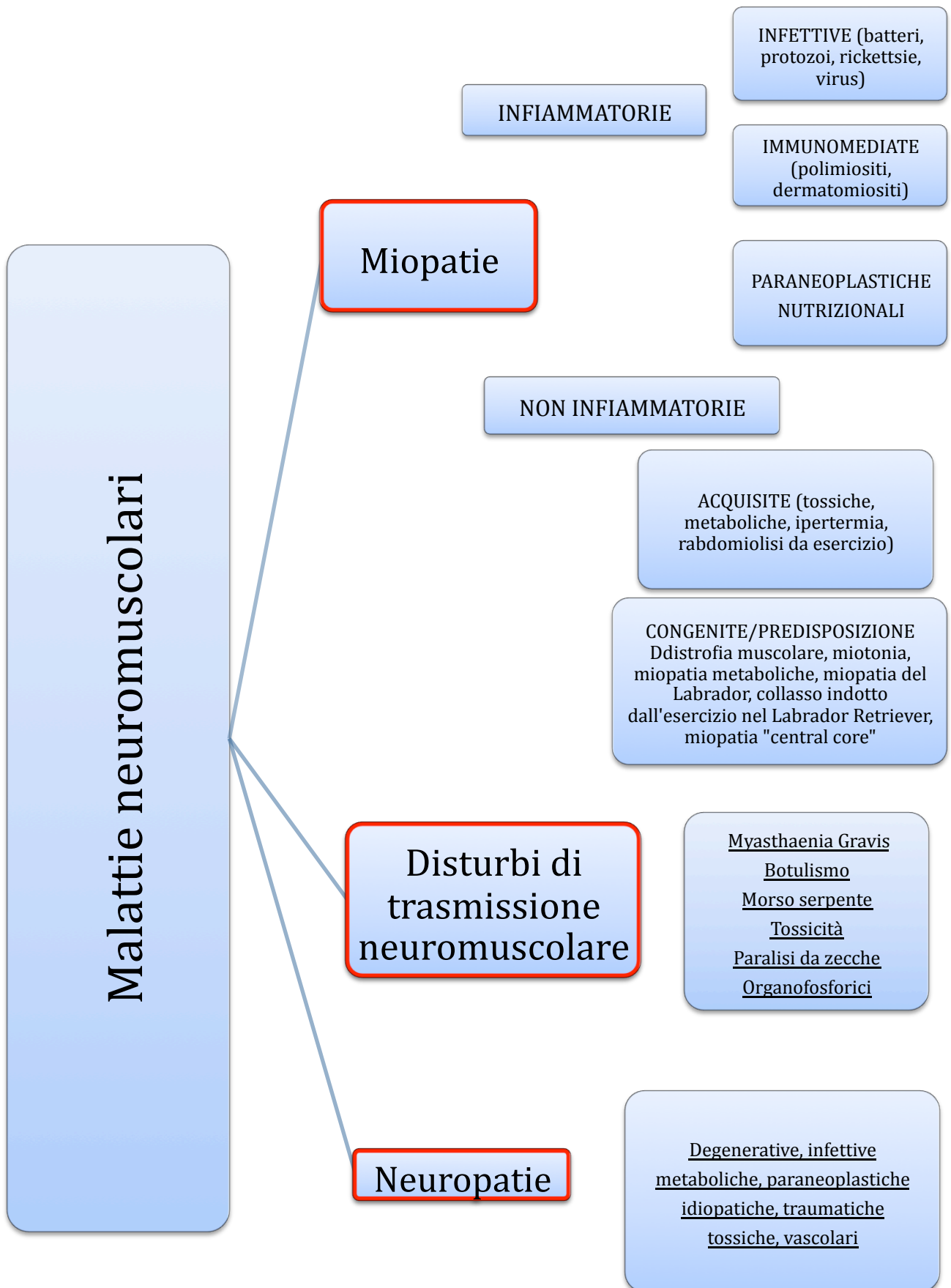


Fig. 3: Classificazione delle malattie neuromuscolari

nervi cranici possono essere alterati causa del coinvolgimento dei muscoli facciali o della masticazione (9).

Da un punto di vista diagnostico, un esame emocromocitometrico completo, un profilo biochimico (inclusi i livelli di creatin chinasi e gli elettroliti) e un esame delle urine dovrebbero essere eseguiti in qualsiasi animale con un sospetto di malattia neuromuscolare. (9)

Altre indagini importanti, anche se non eseguite di routine, si basano sulle informazioni ottenute dal segnalamento e dalla storia del paziente, così come dai ritrovamenti all'Esame Obiettivo Generale e all'Esame Neurologico. Radiografie e in alcuni casi immagini di diagnostica avanzata, inclusa Tomografia Computerizzata (TC) e Risonanza Magnetica (RM), risultano di notevole importanza nella valutazione di molti pazienti con malattie neuromuscolari (9).

L'ELETTRODIAGNOSTICA

Le *indagini elettrodiagnostiche* (EMG, studi di conduzione motoria e studi di conduzione sensitiva) rappresentano il caposaldo nell'iter diagnostico di animali con patologie dei nervi periferici, della giunzione neuromuscolare o del muscolo, permettendo di ottenere informazioni riguardo la gravità, la distribuzione, i caratteri della patologia in atto (10).

L'**elettromiografia** (EMG) negli animali da compagnia, eseguita attraverso l'inserzione di un elettrodo ad ago concentrico in diversi punti e a diverse profondità del ventre muscolare, rappresenta lo studio e la registrazione di attività elettrica muscolare inserzionale e spontanea. A causa della difficoltà di collaborazione, nei nostri pazienti l'elettrodiagnostica necessita dell'anestesia generale (10).

La presenza di attività muscolare spontanea patologica all'EMG (Potenziali di fibrillazione, Onde positive, Scariche ripetitive

complesse e Potenziali miotonici) (Fig.4) indica un'instabilità della membrana del sarcolemma che può essere esito di una denervazione, di polimiosite, distrofia muscolare o altre miopatie. E' importante ricordare che qualsiasi modificazione associata a denervazione nel cane e nel gatto non è rinvenibile se non minimo 4-5 giorni da che l'insulto è avvenuto e che le alterazioni maggiori non sono visibili prima di 8-10 giorni (10).

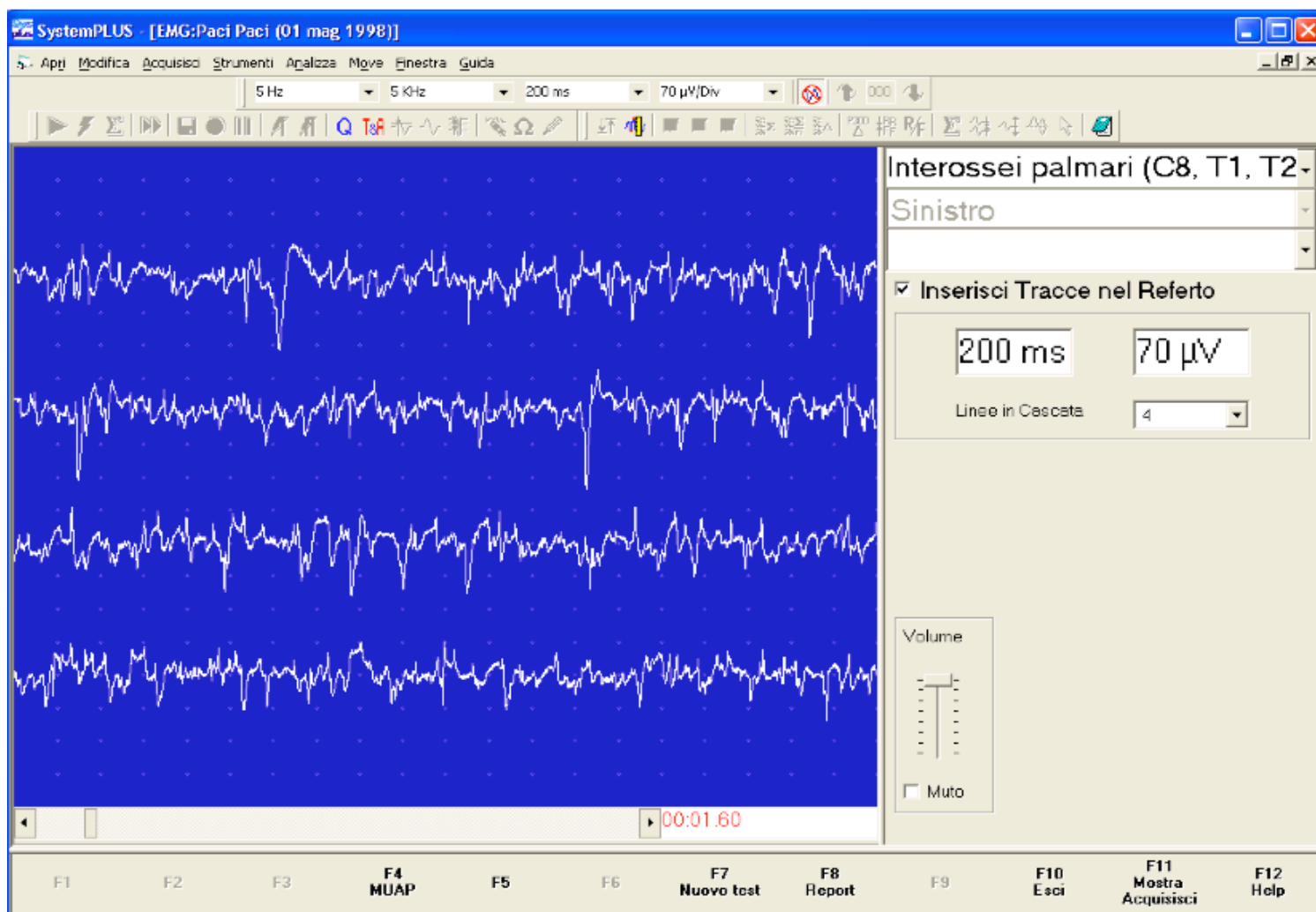


Fig. 4: Elettromiografia ad ago concentrico in cui si evidenzia presenza di potenziali di fibrillazione, onde acute positive.

Gli studi di conduzione nervosa periferica comprendono la valutazione della componente motoria e sensitiva dei nervi periferici e, in alcuni casi, di un numero ridotto di nervi cranici (10).

La conduzione nervosa motoria è l'indagine più utilizzata nei piccoli animali per la valutazione dei nervi periferici; i nervi più comunemente studiati sono: per quanto riguarda i nervi spinali il nervo ulnare e radiale (meno comunemente il mediano) negli arti toracici, il nervo sciatico-tibiale e peroneo comune negli arti pelvici; il nervo facciale e il laringeo ricorrente per quanto riguarda i nervi cranici (10) (Fig.5).

Quando si valuta la componente motoria dei nervi periferici bisogna prendere in considerazione la velocità di conduzione nervosa motoria e la durata, l'ampiezza, l'area del potenziale d'azione muscolare (CMAP) (10).

Le principali alterazioni che possono essere riscontrabili all'EMG sono:

- Una riduzione generalizzata delle ampiezze CMAP senza dispersione temporale, che potrebbe indicare un'assonopatia generalizzata (es. ACP), una grave miopatia (es. polimiositi, miopatia da accumulo di lipidi) o anche una ridotta trasmissione neuromuscolare come nel Botulismo.
- Una velocità di conduzione ridotta senza una significativa riduzione nell'ampiezza del CMAP, indicativa di demielinizzazione; una grave demielinizzazione può portare a polifasia e dispersione temporale del CMAP.
- Una riduzione dell'ampiezza del CMAP prossimale rispetto a quello distale di oltre il 50% senza una significativa dispersione temporale e polifasia. Questo riscontro è tipico dei "blocchi di conduzione" ossia di una demielinizzazione segmentale che si estende per oltre due internodi; gli impulsi nervosi non possono

passare attraverso questa zona, sebbene la conduzione sia mantenuta distalmente.

- Anche una dispersione temporale del CMAP con o senza polifasia è indicativo di demielinizzazione (10).

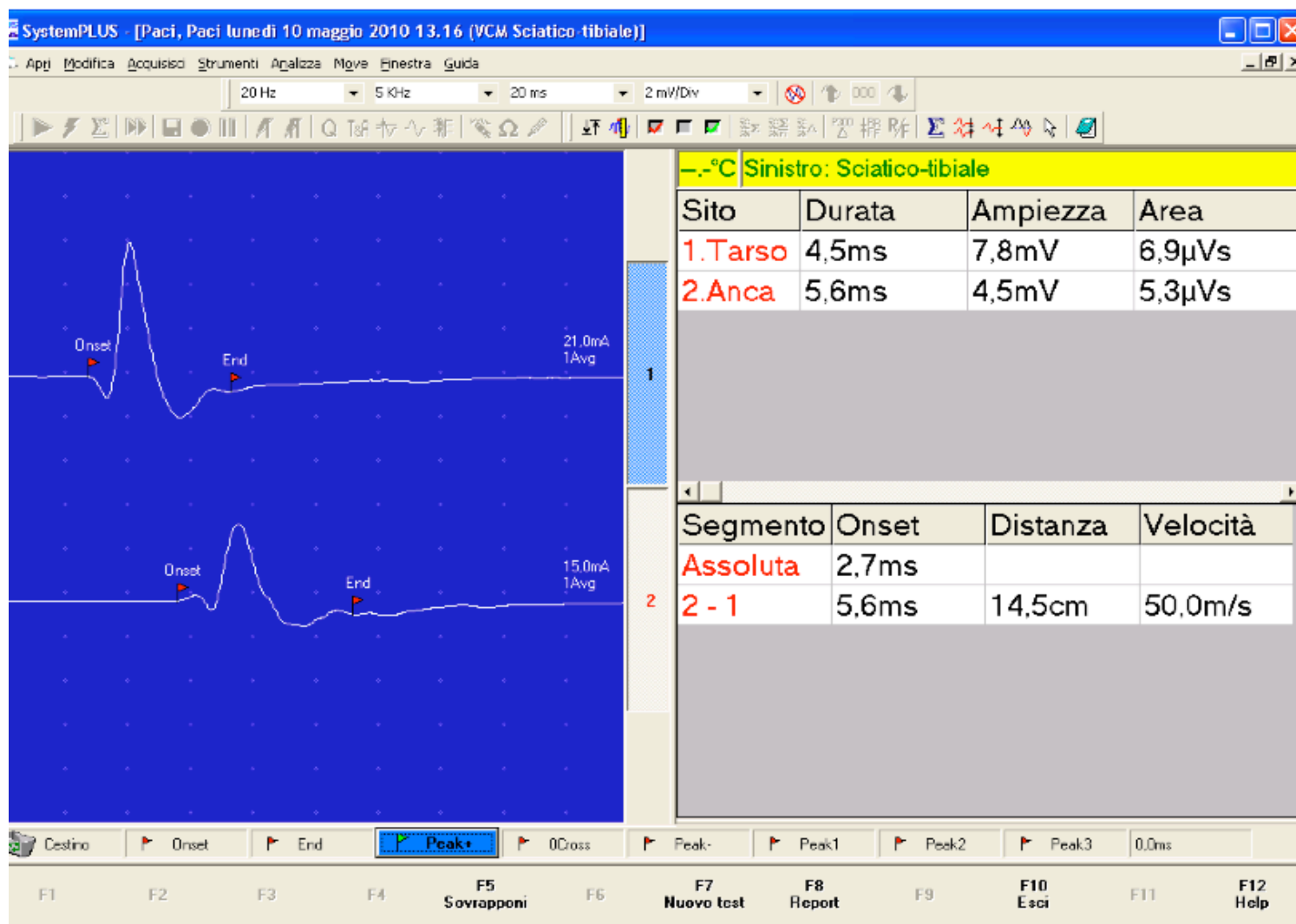


Fig. 5: Velocità di conduzione motoria del nervo sciatico-tibiale con in alto la stimolazione prossimale e in basso la stimolazione distale del nervo

Gli studi di conduzione nervosa sensitiva valutano la componente sensitiva dei nervi misti e dei nervi sensitivi puri (10).

I nervi sensitivi più comunemente oggetto di studio sono il nervo radiale superficiale laterale, il nervo peroneo superficiale, il nervo safeno e il nervo tibiale distale tra i nervi sensitivi e il nervo tibiale prossimale e il nervi ulnari tra i nervi misti (10).

Le principali alterazioni sono a carico della velocità di conduzione sensitiva (SNCV) e dell'ampiezza dei potenziali d'azione nervosa sensitiva (SNAPs) (Fig.6). I tipi di alterazione sono sovrapponibili a quelli già elencate per gli studi di conduzione motoria fatta eccezione per il fatto che le fibre nervose sensitive degenerano solo ed esclusivamente in caso di lesione distale al ganglio sensitivo. Anche in presenza di un'avulsione completa delle le radici nervose pregangliari dal midollo spinale, non avviene una degenerazione delle fibre nervose sensitive distali al ganglio perchè i corpi cellulari sono ancora connessi ai loro assoni (10).

Per quanto riguarda lo studio delle radici nervose dorsali e ventrali, la loro valutazione diretta è difficile a causa della loro relativa inaccessibilità. Attraverso l'utilizzo di una conduzione antidromica nei nervi motori (onde F), la registrazione di un potenziale di campo lontano dalla parte prossimale del midollo spinale (CDPs), e attraverso i normali archi riflessi (riflessi H) è comunque possibile valutare indirettamente le radici nervose. Queste indagini permettono di avere informazioni riguardo le radici nervose (valore prognostico e diagnostico) in corso di polineuropatie, così come riguardo danni a carico del midollo spinale o dei nervi periferici che possono coinvolgere il plesso brachiale e il plesso lombosacrale (10).

Le *onde F* (Fig.7) rappresentano un potenziale d'azione muscolare a lunga latenza che insorge dopo attivazione nervosa motoria antidromica sopramassimale. Questa attivazione antidromica del nervo può avvenire contemporaneamente alla conduzione ortodromica dell'impulso nervoso dal sito di stimolazione, che genera un

potenziale d'azione denominato "onda M" (10).

Una volta che l'impulso nervoso condotto in senso antidromico raggiunge il corpo cellulare (cellula del corno ventrale), parte un segnale secondario condotto in senso ortodromico che arriva alla cellula muscolare molti millisecondi dopo l'onda M (10).

Le onde F rappresentano quindi un evento puramente motorio e valutano la radice nervosa ventrale e la porzione più prossimale dei nervi periferici motori e misti; la loro valutazione permette anche di ottenere informazioni riguardo l'eccitabilità del motoneurone (10).

La valutazione delle onde F ha diversi vantaggi: 1) permette di amplificare le anomalie borderline della funzionalità nervosa per la maggiore lunghezza del tratto studiato rispetto alle sole onde M; 2) la latenza delle onde F ha un intervallo di normalità più ristretto della velocità di conduzione motoria permettendo di evidenziare alterazioni di conduzione più lievi; 3) lo studio delle onde F è un metodo molto più preciso per valutare polineuropatie o danni localizzati esclusivamente nei segmenti prossimali del nervo, così come permette di valutare, da un punto di vista funzionale, il motoneurone del corno ventrale (10).

I parametri che vengono considerati sono la latenza, l'ampiezza massima, la frequenza e la durata delle onde F; altri due parametri che vengono calcolati sono l' "F ratio", che permette di valutare le caratteristiche di conduzione del segmento prossimale del nervo confronto a quello distale, e la velocità di conduzione dell'onda F. I nervi principalmente studiati sono il nervo ulnare e il nervo sciatico-tibiale (10).

Il *Potenziale Cord Dorsum (CDP)* (Fig.6) rappresenta un evento puramente afferente (sensitivo) in quanto non è presente alcun contributo nello sviluppo di questo potenziale da parte delle fibre nervose motorie e delle radici ventrali (10).

Il CDP rappresenta un'aggiunta importante nello studio della componente sensitiva nervosa periferica; permette di valutare in maniera accurata l'estensione e la gravità funzionale di anomalie a carico dei nervi sensitivi prossimali, delle radici nervose dorsali e

delle corna dorsali del midollo spinale (10).

Lo studio del CDP è di notevole importanza nel valutare animali con sospetta neuropatia prossimale, radiculopatia o insulti a carico della radice nervosa, così come in animali con mielopatie che coinvolgono l'intumescenza brachiale o quella lombosacrale. I principali nervi studiati sono il tibiale e il radiale superficiale (10).

Nello studio del CDP si prende in considerazione la latenza d'insorgenza del potenziale d'azione (10).

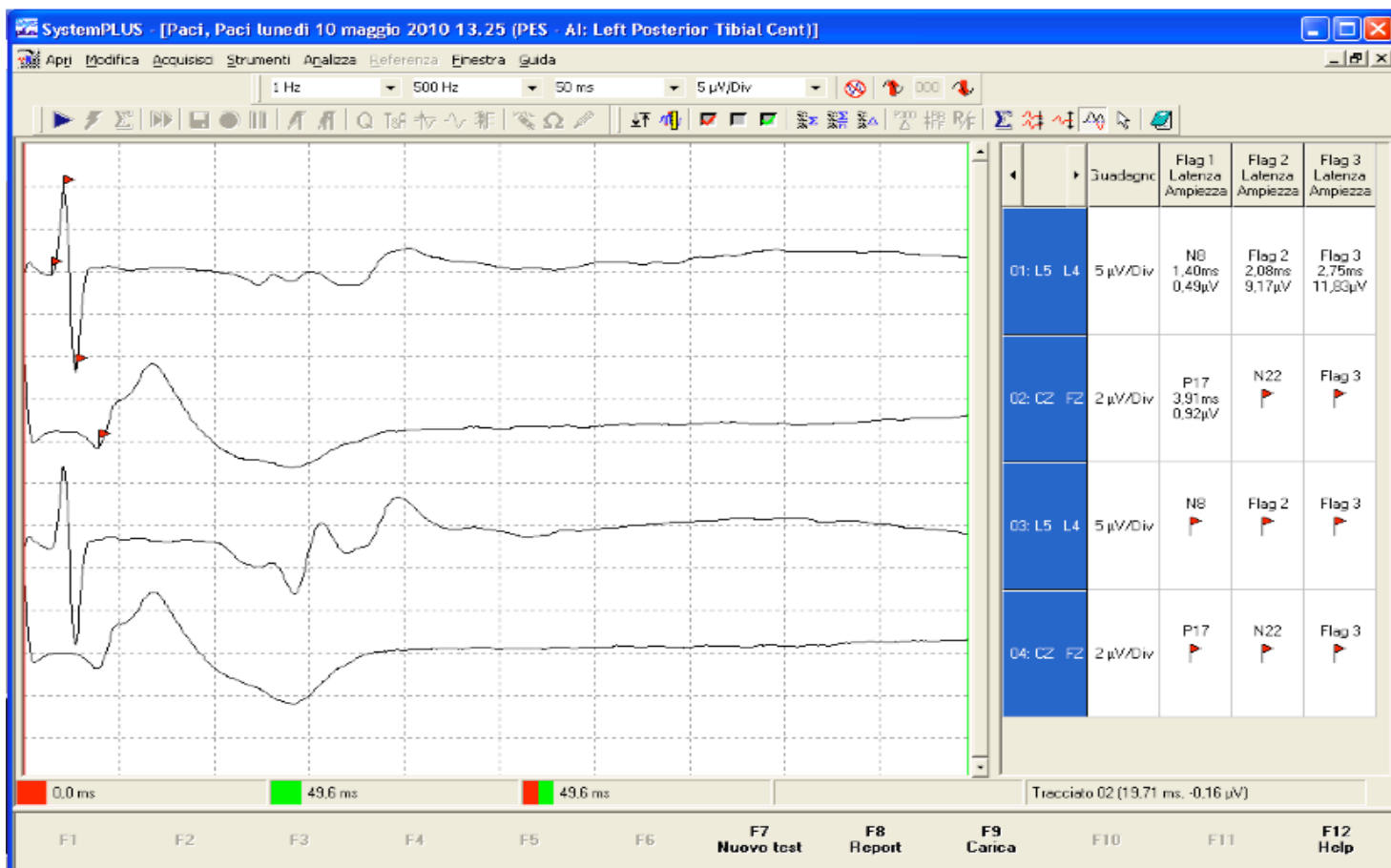


Fig. 6: Potenziale d'azione nervosa sensitiva (1° e 3° tracciato) e potenziale Cord Dorsum (2° e 4° tracciato) nel nervo tibiale.

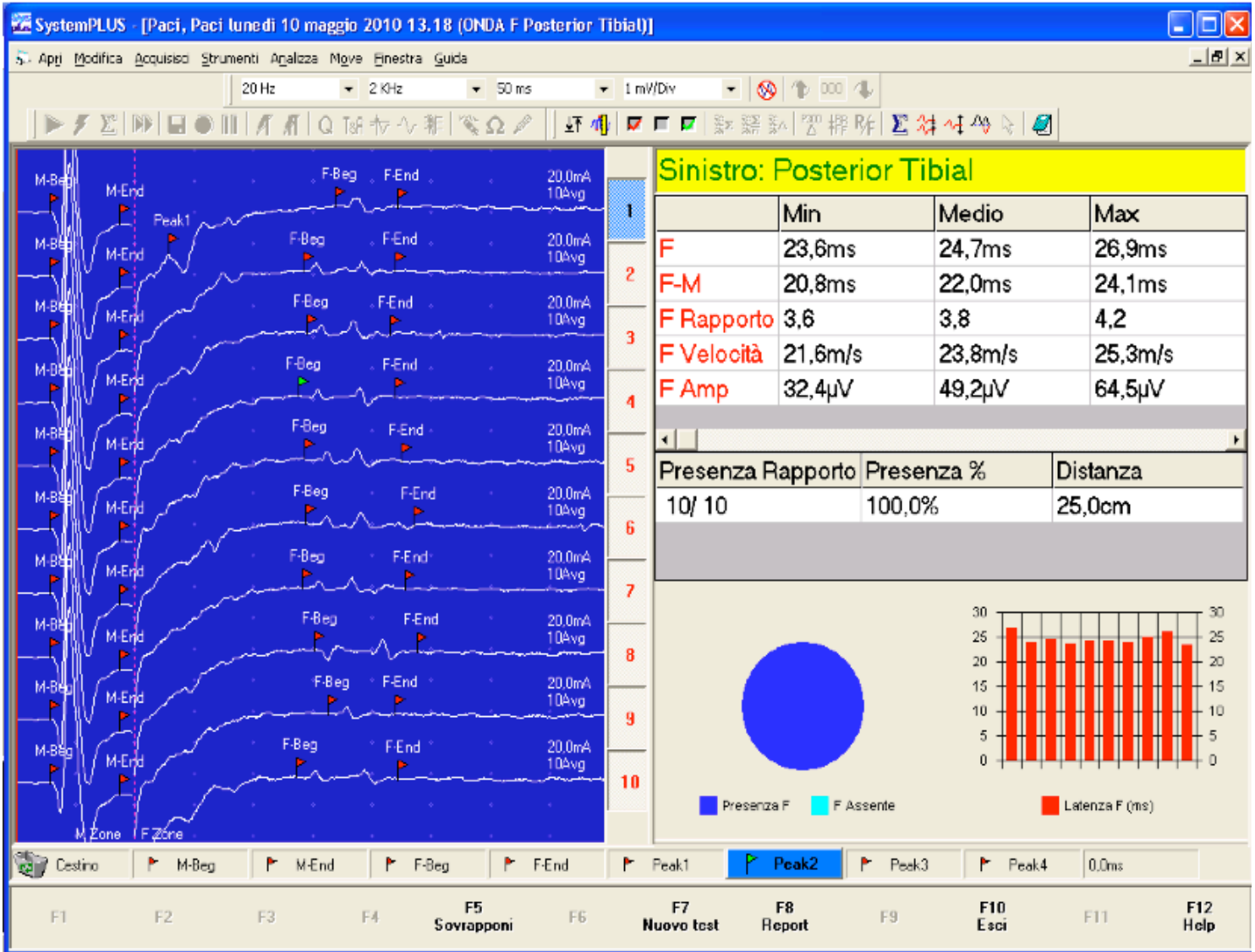


Fig. 7: Onde M e onde F registrate a livello del nervo tibiale

Il *riflesso H* rappresenta un riflesso di stiramento evocato elettricamente; l'arco afferente di questo riflesso è costituito dalle fibre sensitive del gruppo 1A e la componente efferente dall'attivazione della cellula del corno ventrale e del'alfa motoneurone. Il riflesso H è prevalentemente un riflesso monosinaptico che, sebbene fornisca informazioni riguardo la conduzione nervosa attraverso l'intera lunghezza della via afferente ed efferente, non permette di valutare separatamente le radici nervose dorsali e ventrali, rendendo l'importanza di questo studio minore rispetto all'esecuzione delle onde F e del CDP. Sono stati stabiliti valori normali del riflesso H per il nervo ulnare, surale cutaneo caudale e dei nervi sciatico-tibiale prossimale e distale nel cane e del nervo ulnare nel gatto (10).

La valutazione elettrofisiologica della giunzione neuromuscolare consta della stimolazione nervosa ripetitiva sopramassimale e dell'elettromiografia a singola fibra (10).

La stimolazione nervosa ripetitiva sopramassimale (Fig.8) è lo studio elettrodiagnostico più comunemente utilizzato nella valutazione dei disordini della giunzione neuromuscolare compresa la Myasthenia gravis, congenita e acquisita, e il botulismo. L'esame viene eseguito stimolando un nervo periferico con una serie impulsi sopramassimali e valutando allo stesso tempo i CMAPs evocati (10).

Una frequenza di stimolazione da 2 a 3 Hz è preferibile perché è abbastanza veloce da portare ad una deplezione delle riserve di ACh immediatamente disponibili ma abbastanza bassa da evitare di scatenare meccanismi neurosecretori capaci di potenziare la trasmissione neuromuscolare. Le ampiezze e le aree dei potenziali così evocati sono misurati ed espressi come percentuale di decremento rispetto alla primo potenziale d'azione evocato (10).

Con una stimolazione a bassa frequenza (3 Hz o meno) non deve essere presente, durante il treno di stimoli, un decremento di oltre il 10% in cani adulti normali; un decremento di oltre il 10 % è presente nei casi Myasthenia gravis mentre una risposta incrementale può

essere presente in corso di Botulismo (10).

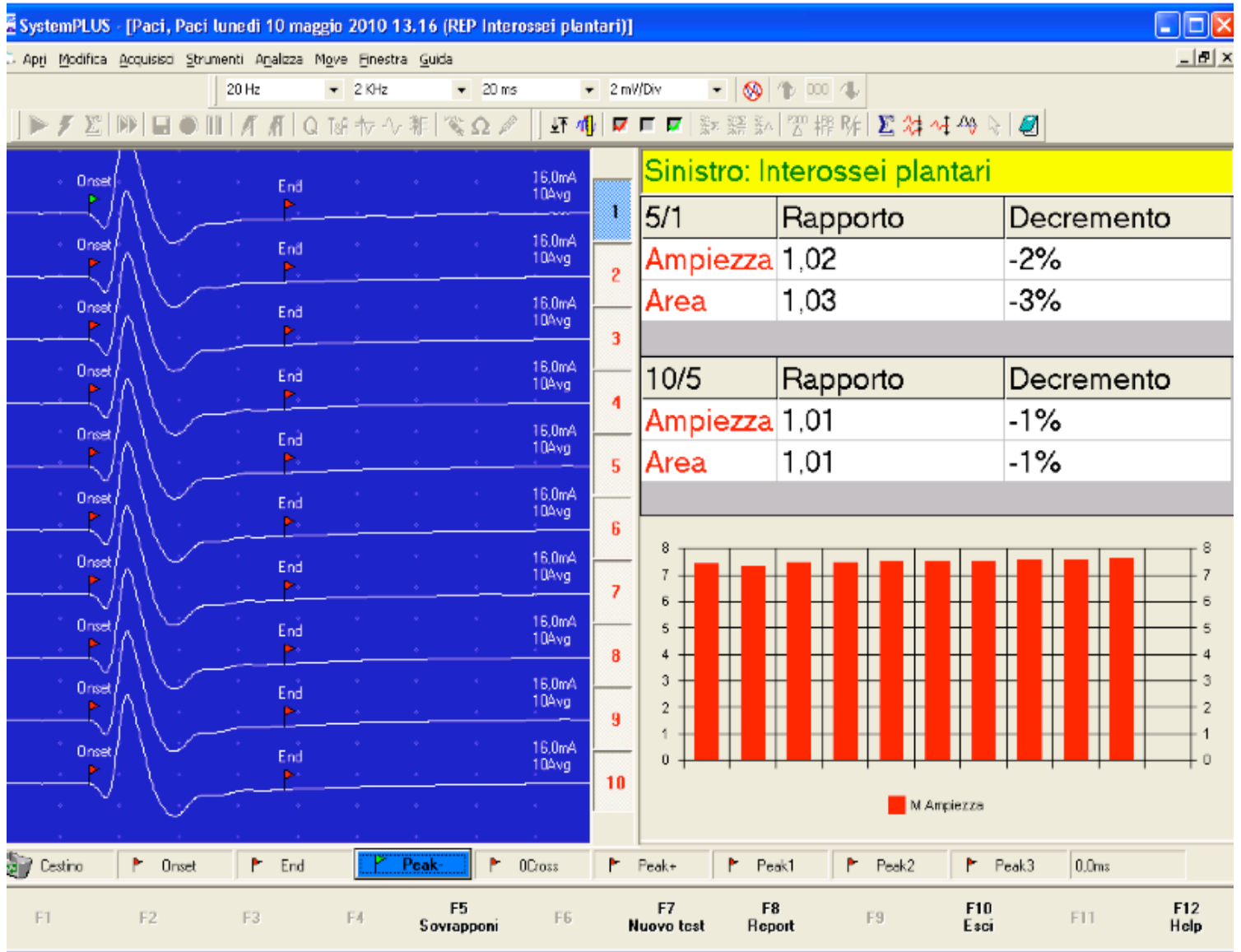


Fig. 8: Stimolazine nervosa ripetitiva registrata dai muscoli interossei plantari

1.3

POLIRADICOLONEURITE ACUTA DEL CANE

La poliradicoloneurite acuta canina (ACP) o “paralisi del cane da caccia al procione” (CHP) è una delle neuropatie periferiche maggiormente riscontrate in Nord America ed è considerata essere l’equivalente canino della polineuropatia acuta umana definita “Sindrome di Guillain-Barre” (GBS). Il termine “paralisi del cane da caccia al procione” dipende dal fatto che nei cani destinati alla caccia al procione è presente, come conseguenza del contatto con la saliva del procione, un’incidenza relativamente alta di questa neuropatia (11).

La presenza della CHP in altre zone degli Stati Uniti e in molti altri Paesi del mondo in cui non è presente una popolazione naturale di procioni lascia pensare che ci siano altri fattori eziologici come possibili candidati per questa neuropatia; tra questi sono stati proposti: vaccinazioni recenti specialmente contro la Rabbia, recenti infezioni virali delle alte vie respiratorie, recenti infezioni gastroenteriche

batteriche o virali (11).

Nella ACP, le radici nervose ventrali dei nervi periferici e le loro componenti sviluppano i caratteri patologici più gravi, i quali riguardano vari gradi di degenerazione assonale, demielinizzazione paranodale e segmentale e infiltrazione di cellule infiammatorie. Il tipo di cellule infiammatorie varia in relazione alla durata dei segni clinici: nei casi di un'evoluzione iperacuta sono presenti prevalentemente neutrofili e un piccolo numero di cellule mononucleate, mentre in quelli che presentano un'evoluzione cronica il quadro è dominato da linfociti, plasmacellule e macrofagi (11).

Le radici nervose ventrali lombari e sacrali sono, in genere, interessate in maniera più grave rispetto a quelle cervicali e toraciche (11).

E' inoltre presente un interessamento più lieve della parte distale dei nervi periferici rispetto alle radici nervose ventrali; nonostante sia presente un coinvolgimento delle radici nervose dorsali, questo è indubbiamente lieve a confronto dell'interessamento delle radici nervose motorie (11).

Il riscontro istopatologico di un quadro di degenerazione assonale sembra essere più consistente nella ACP rispetto alla GBS, specialmente nei cani con le forme più gravi di malattia (11).

L'esatta patogenesi dell'ACP non è al momento conosciuta; il meccanismo patogenetico più probabile sembra di tipo autoimmune, come quello alla base della GBS. I meccanismi proposti includono: lo svilupparsi di un'immunità umorale e cellulo-mediata che si sviluppa contro un agente infettivo presente nel sistema nervoso e che si rende responsabile del successivo danno mielinico e assonale; un'altra possibilità, più accreditata, riguarda l'azione di autoanticorpi e di un'immunità cellulo-mediata diretta primariamente verso lipidi o proteine dei nervi periferici (11).

Nelle patologie immuno-mediate è necessario, affinché la malattia si possa instaurare, che gli epitopi bersaglio situati sulla membrana mielinica siano accessibili agli anticorpi presenti nel circolo ematico; questo presuppone non solo che gli epitopi siano esposti sulla superficie esterna della membrana mielinica ma anche che la barriera

emato-nervosa sia danneggiata (11).

Le porzioni oligosaccaridiche dei glicolipidi, delle glicoproteine o dei proteoglicani si trovano all'esterno della membrana plasmatica della guaina mielinica e sono in una giusta posizione per essere oggetto dell'attacco immunitario; sembra che molti anticorpi (IgG o IgM) reagiscano verso glicolipidi acidi, principalmente gangliosidi, che vengono riconosciuti come antigeni. I bersagli principali sembrano essere rappresentati dai gangliosidi GM1, asialo-GM1 e GT1b, così come dal sulfoglucoronil-paragloboside (SGPG), sebbene il bersaglio vari in relazione all'evento primario scatenante (11).

Sembra che ci sia una porzione specifica di carboidrati (Gal(B1-3)GalNAc) presente su questi glicolipidi, reputata importante nello scatenare l'attacco anticorpale; si pensa che almeno in alcuni casi di GBS avvenga un mimetismo molecolare e che i lipopolisaccaridi dei batteri, specialmente di *Campylobacter jejuni* e di *Campylobacter coli*, contengano un epitopo ganglioside-simile (Gal(B1-3)GalNAc) che ricorda i gangliosidi dei nervi periferici (GM1, asialo-GM1, GalNAc-GD1a, and SGPG) (11).

Studi sulla natura del potenziale attacco immunitario nella CHP sono stati portati avanti da Cuddon e col. che hanno rivelato, mediante l'utilizzo della cromatografia a strato sottile, la presenza di IgG dirette verso numerosi nervi periferici o glicolipidi della mielina quali gangliosidi GM1, una o entrambe le bande di SGPG e sulfatide. L'elevata frequenza con cui i glicolipidi sembrano svolgere il ruolo di antigeni può essere correlata alla vicinanza dell'epitopo della CHP alla membrana a doppio strato, rispetto ad altri glicoconiugati quali le glicoproteine. Analisi Western Blot eseguite da Cuddon et col. fallirono nel rilevare IgG contro le glicoproteine della mielina dei nervi periferici in cani con ACP confermata (11).

Esistono una serie di meccanismi attraverso i quali il legame dell'anticorpo ai glicoconiugati della superficie cellulare potrebbe causare neuropatia. Tra questi sarebbero inclusi: una lisi cellulare complesso-mediata successiva all'attacco del complemento o della membrana, l'attivazione di cellule fagocitarie da parte del complemento, una citotossicità cellulosa-mediata anticorpo-dipendente,

un'interferenza con la normale funzione nell'interazione cellula-cellula e un'alterazione della normale funzione cellulare secondaria ad un fenomeno di endocitosi dell'anticorpo (11).

Indipendentemente o contemporaneamente ai meccanismi umorali c'è una forte evidenza che un'immunità cellulo-mediata giochi un ruolo nell'attacco dei nervi periferici sia nella ACP che nella GBS (11).

Il danno iniziale della BNB è in parte indotto dal rilascio di interferone (IFN) dalle cellule T circolanti. L'IFN promuove l'espressione di molecole di adesione nelle cellule endoteliali e nelle cellule mononucleari, aumentando la capacità di pinocitosi da parte delle cellule endoteliali; questo permette il passaggio di mediatori dell'infiammazione, immunoglobuline e leucociti (incluse cellule T CD4 e CD8) attraverso la BNB. L'autoreazione dei linfociti T CD4 contro le cellule presentanti antigene all'interno dei nervi induce una proliferazione clonale delle cellule B, le quali fabbricherebbero proteine anticorpali antigangliosidi, antiglicolipidi e antimielina. Queste cellule T attivate dal rilascio di IFN, sarebbero inoltre responsabili del reclutamento di macrofagi, che svolgono sia l'azione di attaccare direttamente la mielina e gli assoni attraverso un'operazione di fagocitosi, sia quella di danneggiare indirettamente gli assoni mielinizzati attraverso il rilascio di radicali liberi dell'ossigeno e di componenti del complemento (11).

I primi segni clinici compaiono generalmente negli arti pelvici con una successiva progressione rapida ascendente a coinvolgere gli arti toracici; in alcuni casi è stata notata un'insorgenza inversa dei segni clinici, con un interessamento iniziale e più grave degli arti toracici. Generalmente la fase di progressione della malattia dura approssimativamente 5 giorni, sebbene possa durarne anche 10 (11).

Il grado di progressione neurologica durante questo periodo è variabile: alcuni cani rimangono tetraparetici pur continuando ad avere movimenti volontari in tutti e quattro gli arti per tutta la durata della malattia, altri mostrano una paralisi completa di tutte le zampe, incapacità di tirare su testa e collo e sviluppano una grave compromissione respiratoria conseguente alla paralisi dei muscoli

intercostali e del diaframma. In quest'ultimo caso può avvenire una paralisi respiratoria completa (11).

L'esame neurologico mostra generalmente nelle prime fasi della malattia un'iporiflessia o ariflessia e un'ipotonia o atonia generalizzata; disfonia o afonia accompagnano generalmente i segni da motoneurone inferiore generalizzati. Un'altra caratteristica di questa malattia è la presenza di vari gradi di iperestesia, evidente dal fastidio mostrato dall'animale alla manipolazione di tronco ed estremità (11).

Il manifestarsi di una grave atrofia muscolare neurogena è un reperto costante, sebbene non sia visibile nello stadio iniziale. I cani possono inoltre sviluppare, occasionalmente, una paresi o una paralisi facciale bilaterale. Nonostante la grave paresi o paralisi che insorge in questa neuropatia, la maggior parte dei cani rimangono vigili e responsivi all'ambiente circostante, sono capaci di scodinzolare vigorosamente, continuano a bere e mangiare e sono capaci di urinare e defecare in maniera autonoma; alcuni cani non urinano spontaneamente nelle prime fasi della malattia (11).

Una volta che la fase progressiva della ACP è terminata il cane raggiunge una stabilità nel grado di paresi o paralisi, per un periodo che varia da 2-3 settimane fino a 4-6 mesi. La durata dei segni clinici sembra correlarsi alla gravità della paresi o paralisi presente al momento in cui la fase di progressione della malattia è terminata. Più è grave la paresi o paralisi, più il tempo di recupero sembra essere lungo (11).

Sembra che non sia presente alcuna forma di immunità a questa malattia che può presentarsi diverse volte in un cane che continua ad entrare in contatto con l'agente scatenante (11).

Nell'iter diagnostico per l'ACP, il primo importante step è quello di raccogliere informazioni riguardanti qualsiasi evento accaduto nelle 2 settimane antecedenti che possa aver scatenato l'insorgere dei segni clinici (11).

Un esame neurologico completo e accurato è indubbiamente

fondamentale per portare il medico veterinario ad una diagnosi clinica e per permettere di differenziare questa neuropatia da altre cause di tetraparesi acuta da LMN nel cane quali botulismo, paralisi da zecche e myasthenia gravis fulminante (11).

L'unica alterazione che può essere osservata agli esami ematici di cani affetti da ACP è un aumento nei livelli di IgG; le IgM e le IgA rimangono normali (11).

Gli indicatori elettrofisiologici più attendibili di ACP sono: presenza di attività spontanea all'EMG (100% dei casi) in particolar modo se l'indagine viene eseguita a distanza di un minimo di 4 giorni dall'insorgenza dei segni clinici, diminuzione dell'ampiezza dei potenziali d'azione muscolari (CMAP) (80% dei casi), aumento della latenza minima delle onde F o assenza delle stesse, aumento dell' F ratio (92 % dei casi) e diminuzione dell'ampiezza delle onde F (67% dei casi) (12). Le alterazioni elettrofisiologiche riscontrate supportano i ritrovamenti istopatologici presenti in corso di ACP, confermando un'assonopatia riguardante il nervo periferico e la radice nervosa motoria. A livello delle radici nervose ventrali e delle regioni più prossimali dei nervi motori periferici è inoltre presente un quadro di demielinizzazione (latenza dell'onda F prolungata ed F ratio aumentata), molto meno evidente nelle parti più periferiche dei nervi motori (11).

L'analisi del liquido cefalorachidiano (LCR) lombare nei cani con ACP mostra un incremento nel contenuto proteico, sebbene questo non sia presente nelle prime fasi di malattia. Questo ritrovamento è presente anche nei pazienti affetti dalla GBS (11).

Un test ELISA allestito utilizzando come antigene saliva di procione diluita 1:2000, ha mostrato un'alta sensibilità e specificità nell'identificare anticorpi circolanti specifici per la saliva di procione in cani con ACP confermata. Tutti i cani con segni clinici di ACP e con anamnesi di contatto con dei procioni hanno dimostrato un risultato da moderatamente a fortemente positivo al test ELISA; la maggior parte dei cani con ACP ma senza contatto risaputo con procioni non hanno dimostrato nessun anticorpo circolante contro la saliva di procione. Tutti i cani normali e quelli con altre malattie non

collegate del sistema nervoso centrale e periferico, non mostravano lo stesso risultato da moderatamente a fortemente positivo al test ELISA che mostravano i cani con ACP confermata. La maggior parte dei cani con un test ELISA positivo nella fase iniziale della malattia, continuavano a rimanere positivi per l'intera durata della malattia, nonostante un recupero completo (11).

Da un punto di vista terapeutico non c'è al momento una terapia specifica effettiva dimostrata per l'ACP; l'utilizzo di una terapia precoce basata sulla somministrazione endovenosa di alte dosi di immunoglobuline è stata diffusamente impiegata nella GBS (1 g/kg/die per 2 giorni consecutivi o 0.4 g/kg/die per 4-5 giorni consecutivi) e ha mostrato una riduzione significativa della gravità della malattia, riducendo il tempo di recupero; nella GBS la plasmateresi si è dimostrata avere un'efficacia sovrapponibile alla terapia endovenosa con immunoglobuline in termini di accorciamento dei tempi di ventilazione meccanica, di miglioramento dell'invalidità alle 4 settimane, di riduzione dell'invalidità residua e di prevenzione del decesso (13). Studi preliminari eseguiti in questi ultimi anni utilizzando un protocollo simile a quello impiegato nelle persone con GBS sembrano dimostrare un miglioramento clinico nei cani con ACP trattati con immunoglobuline umane normali (11).

La fluidoterapia endovenosa con soluzioni di Ringer Lattato diventa necessaria solo nel caso in cui il cane si presenti, per incapacità di abbeverarsi, disidratato all'EOG (11).

I corticosteroidi non dovrebbero essere utilizzati nel cane con ACP perché non è dimostrato migliorino o accorcino il decorso della malattia una volta che il cane ha mostrato i primi segni clinici. Nei pazienti affetti dalla GBS, è stato visto che i corticosteroidi sono implicati in una riduzione del grado di sopravvivenza (11).

Nello stadio progressivo della patologia (specialmente durante i primi 4-5 giorni), i cani dovrebbero essere strettamente monitorati in clinica per il possibile insorgere di problemi respiratori. Gli animali che mostrano gravi segni di compromissione respiratoria dovrebbero essere ricoverati in terapia intensiva; potrebbe essere necessaria la

ventilazione assistita. Una volta stabilizzati, i cani possono tornare a casa per continuare la terapia di supporto; generalmente riescono a mangiare e bere se riescono a raggiungere cibo e acqua, ma spesso è necessario alimentarli dalla mano (11).

Un'intensa fisioterapia è fondamentale nella gestione della neuropatia; permette di ridurre l'atrofia muscolare neurogena e di mantenere la mobilità articolare. Un cambio frequente di decubito e un rivestimento della cuccia con materiale morbido sono essenziali per prevenire l'insorgere di piaghe da decubito (11).

La maggior parte dei cani con ACP recupera completamente sebbene, nei cani colpiti in maniera più grave, possano residuare dei blandi deficit neurologici. La durata dei segni clinici varia da diverse settimane nei cani affetti lievemente o moderatamente, fino a 4-6 mesi nei cani con i quadri più gravi (11).

MATERIALI E METODI

2.1

SOTTOTIPIZZAZIONE NEUROFISIOLOGICA

Il primo obiettivo del nostro studio, la tipizzazione neurofisiologica dei cani con diagnosi di ACP, vedeva incluso un numero totale di 15 cani di cui 11 erano di sesso maschile e 4 di sesso femminile con un'età variabile dai 2 a 13 anni (9,1 anni di media) Tab.1.

Nello studio, tutti i cani venivano sottoposti ad una valutazione elettrodiagnostica completa che includeva elettromiografia (EMG), stimolazione ripetitiva, studi di conduzione nervosa (MNCS), onde F e valutazioni sensitive (studi di conduzione nervosa sensitiva SNCS e/o potenziali "Cord Dorsum" CDP) in almeno un 1 nervo tibiale e un nervo ulnare. Venivano quindi classificati come AIDP i cani che mostravano almeno un segno di demielinizzazione (valori di velocità di conduzione motoria 2 volte la deviazione standard al di sotto dei valori normali, rapporto tra ampiezza del potenziale d'azione muscolare CMAP prossimale/distale $< 0,5$, rapporto tra area del CMAP prossimale/distale $< 0,5$, latenza minima dell'onda F $> 150\%$ rispetto alla latenza attesa, modificazioni nella durata del CMAP $>15\%$) in 2 o più nervi; i cani con CMAP ridotto che non

soddisfavano i criteri d'inclusione per il sottotipo AIDP, venivano classificati come sottotipo assonale motorio puro (AMAN) o assonale motorio e sensitivo (AMSAN), qualora mostrassero un concomitante coinvolgimento delle fibre sensitive (potenziale d'azione nervoso sensitivo SNAP o velocità sensitiva due volte la deviazione standard al di sotto dei valori normali oppure latenza d'insorgenza del CDP > della latenza attesa). Gli studi elettrodiagnostici venivano eseguiti in anestesia generale utilizzando l'elettromiografo "Myoquick" (Micromed, Mogliano Veneto (TV), Italia).

<i>Cane</i>	<i>Razza</i>	<i>Età (A)</i>	<i>Sesso</i>	<i>Presentazione neurologica</i>
1	<i>Meticcio</i>	8	<i>M</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
2	<i>Pastore Australiano</i>	8	<i>F</i>	<i>Moderata/grave tetraparesi non ambulatoria</i>
3	<i>Alaskan Malamute</i>	1	<i>M</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
4	<i>Barboncino</i>	10	<i>F</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
5	<i>Jack Russel</i>	10	<i>M</i>	<i>Grave tetraparesi non ambulatoria</i>
6	<i>Meticcio</i>	7	<i>M</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
7	<i>Alano</i>	9	<i>M</i>	<i>Grave tetraparesi non ambulatoria</i>
8	<i>Meticcio</i>	10	<i>M</i>	<i>Lieve tetraparesi, deficit nervo facciale, afonia</i>
9	<i>Meticcio</i>	8	<i>M</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
10	<i>Pastore Tedesco</i>	11	<i>M</i>	<i>Grave tetraparesi/Tetraplegia</i>
11	<i>Segugio Italiano</i>	8	<i>M</i>	<i>Lieve/moderata tetraparesi</i>
12	<i>Meticcio</i>	10	<i>M</i>	<i>Moderata tetraparesi</i>
13	<i>Meticcio</i>	10	<i>F</i>	<i>Moderata tetraparesi</i>
14	<i>Maltese</i>	2	<i>F</i>	<i>Lieve paraparesi</i>
15	<i>Shih-Tzu</i>	12	<i>F</i>	<i>Lieve tetraparesi</i>

Tab 1: segnalamento e segni clinici nei cani testati.

2.2

PRESENZA DI AUTOANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI

Per soddisfare il secondo obiettivo del nostro studio, verificare la presenza di anticorpi anti-gangliosidi nei sieri di cani con ACP, abbiamo aliquotato il sangue raccolto da 29 pazienti, in 10 campioni di siero da 200 μ l e li abbiamo conservati a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in attesa che venissero testati.

Per testare i nostri sieri ci siamo avvalsi della collaborazione con il “Glasgow Biomedical Research Centre”, centro di medicina umana impegnato in particolare nella ricerca riguardo la risposta autoimmune nella Sindrome di Guillaine-Barrè (GBS), alimentando nel contempo con i nostri campioni la ricerca in ambito della poliradicoloneurite acuta del cane.

Trattandosi di uno studio caso-controllo abbiamo inviato al laboratorio scozzese, oltre i 29 sieri dei pazienti affetti da ACP, i sieri di 29 cani sani, sovrapponibili ai soggetti affetti da ACP per razza ed età.

La metodica messa a punto nel centro di ricerca scozzese prende il nome di “PDVF glycoarray” e consiste in un campionatore automatico per cromatografia a strato sottile (TLC) che permette di creare gruppi di glicolipidi facilmente riproducibili e dei loro complessi

eterodimerici che vengono fissati su una membrana sintetica di polivinildifluoride (PVDF). Di seguito riporteremo in breve la metodica (14).

Le soluzioni di lavoro vengono ottenute diluendo i glicolipidi in metanolo in modo da raggiungere una concentrazione di 0,1 ug/ml; per formare i complessi, una miscela 50:50 (v/v) in metanolo costituita da gangliosidi di due componenti viene sonicata per 3 minuti. Un autocampionatore TLC viene quindi utilizzato per posizionare i gangliosidi singoli e i loro complessi su membrane di PVDF in predeterminate locazioni; le membrane di PVDF vengono quindi fissate su vetrino e fatte asciugare in una cappa di fumo per 20 minuti, quindi lasciate riposare tutta una notte a 4°C prima dell'utilizzo (14).

Le membrane vengono poi fissate in BSA/PBS al 2% e poi esaminate alla stesso modo con l'anticorpo primario (1 ug/ml) e con quello secondario (diluito 1/30000) (14).

L'individuazione viene effettuata attraverso una reazione di chemiluminescenza ECL plus (Amersham), visibile su pellicola radiografica; le pellicole vengono quindi digitalizzate tramite uno scanner a letto piatto e le immagini quantificate attraverso il software ImageQuant TL (Amersham) (14).

RISULTATI

Scariche anomale all'EMG erano presenti in tutti i cani (100%) dello studio. Nelle tabelle 2, 3 e 4 sono riportati i risultati degli altri test eseguiti su ciascun cane. Sulla base dei dati così ottenuti e rifacendoci ai criteri di inclusione precedentemente illustrati, 6 cani (40%) venivano identificati come appartenenti al sottotipo AIDP, 5 (33%) e 4 cani (27%) al sottotipo AMAN e AMSAN rispettivamente (Tab. 5).

1	AMAN
2	AIDP
3	AMSAN
4	AIDP
5	AMSAN
6	AIDP
7	AMSAN
8	AMAN
9	AMAN
10	AIDP
11	AMAN
12	AIDP
13	AMAN
14	AMSAN
15	AIDP

Tab. 5: Classificazione dei cani sulla base delle
le caratteristiche elettrodiagnostiche

Dog	Prox tibial amp (mV)	Dist tibial amp (mV)	Tib amp ratio	Prox ulnar amp (mV)	Dist ulnar amp (mV)	Uln amp ratio	Prox tib dur (ms)	Dist tib dur (ms)	% change	Prox uln dur (ms)	Dist uln dur (ms)	% change	Tib area ratio	Uln area ratio
1	4,5	5	0,9	3,3	5,9	0,56	7,8	8	-2,56	4	3,6	10	0,64	0,82
2	0,47	0,63	0,75	1,9	3,3	0,57	19,6	14,7	25	10,6	8,8	17	0,92	0,62
3	1,4	1,2	1,16	2,8	3,7	0,76	8,4	7,6	9,5	8	7,1	11,25	1,58	0,88
4	5,8	14,1	0,41	6,8	13,7	0,5	6,5	4,3	33,85	6,08	5,32	12,5	0,42	0,4
5	4,4	6,1	0,72	1,2	1,4	0,86	6,4	5,8	9,4	7,8	8,3	-6,4	0,81	0,65
6	3	5,7	0,53	3,6	9,9	0,38	11,5	7,3	36,53	4,4	4,4	0	0,52	0,47
7	0,02	0,02	0,9	3,3	5,6	0,59	2,9	3,6	-24,1	10,6	10,2	3,8	1	0,77
8	2,7	4,3	0,63	5,8	5,1	1,1	6,6	5,8	12,13	4,3	3,7	14	1,2	0,85
9	1,6	2,5	0,64	1,5	2	0,75	4,5	3,5	22,3	3,8	3,5	7,9	1,15	1
10	2,6	2,4	1,08	1,7	1,07	1,59	14	10,6	24,3	7,1	4,08	42,5	1,2	1,9
11	6,4	11,6	0,55	9,5	9,07	1	4	5,28	-32	4,9	4,9	0	0,45	1,4
12	3,5	16,2	0,22	5,4	9,3	0,58	12,3	10,1	17,9	8	6,3	21,25	0,47	0,79
13	1,8	2,1	0,86	1,9	2	0,95	5,6	5	10,7	6,7	6,5	3	1,09	1,2
14	3,8	6,9	0,55	1,5	2,9	0,52	5,4	4,8	11,2	4,2	4,2	0	0,66	0,58
15	4,5	7,8	0,58	4,9	5,9	0,83	5,5	4,3	21,8	4,9	4,2	14,3	0,76	0,92

Tabl. 2: Ampiezze dei potenziali d'azione muscolari (CMAP) dopo la stimolazione del nervo sciatico-tibiale e ulnare, durata del CMAP ulnare e sciatico-tibiale, rapporto tra l'ampiezza del potenziale d'azione muscolare prossimale:distale (in relazione alla percentuale di cambiamento della durata del CMAP) e tra area del CMAP prossimale:distale per il nervo sciatico-tibiale e ulnare nei cani testati. Celle più scure con numeri rossi = valori alterati

Dog	Tib MNCV (m/s)	Tib F waves lat (ms)	Expected (ms)	Tibial F ratio	Tib F wave amp (mV)	Uln MNCV (m/s)	Uln F wave lat (ms)	Expected (ms)	Uln F Ratio	Uln F wave amplitude (mV)
1	60,9	14,8	14,8	2,18	1,4	52	13,2	13,2	2,3	0,7
2	48,1	28,3	18,3	1,3	0,44	34	21	15	2,7	0,68
3	51,2	NR	-	-	NR	62,8	20,7	17,9	4,5	0,11
4	48,9	16,1	12,8	3,9	0,65	45,1	NR	-	-	-
5	61,5	15,1	11	2,01	0,41	40	NR	-	-	-
6	60	19	14	3	0,42	39	15,7	12,2	5	0,12
7	43,9	NR	-	-	NR	52,7	29,2	21,9	3,3	0,04
8	65,1	16,7	14,4	2	0,24	55,3	14,9	14,5	2,9	0,4
9	63,5	15	12,7	1,7	0,25	60,7	11,5	11,4	1,8	0,68
10	31,4	34,8	21,3	3,8	0,35	51	26,4	17,7	4,6	0,39
11	44,7	19,2	18,6	2,17	0,51	51	18	15	1,5	0,44
12	53,5	16,7	14,2	1,7	0,25	54,3	17,7	15,2	3,3	1,1
13	58,8	19,7	15,9	2,5	0,32	47,1	22,9	13,1	5,5	0,21
14	56,5	11,7	10,09	3,5	0,76	57,9	13,2	10,4	3,4	0,25
15	50	12,4	11,5	1,6	0,23	34,1	13,3	10,8	3,2	0,1

Tab. 3: Velocità di conduzione nervosa motoria (MNCVs), latenza delle onde F, F ratio, ampiezza delle onde F dei nervi sciatico-tibiale e ulnare in 15 cani con poliradicoloneuropatia acuta. Celle più scure con numeri rossi = valori alterati; NR = Non Registrabile

<i>Dog</i>	<i>Tibial SNCV (m/s)</i>	<i>Tibial SNAP amp (uV)</i>	<i>Ulnar SNCV (m/s)</i>	<i>Uln SNAP amp(uV)</i>	<i>Cord Dorsum Lat (ms)</i>	<i>Expected (ms)</i>
1	78	-	59	10	3,3	3,3
2	68,7	-	70,5	7,32	6,77	5
3	71,4	-	-	-	9,09	7,4
4	-	-	-	-	9,8	3,1
5	50 75	8,7	50	13	3,8	2
6	-	-	-	-	3,54	3,3
7	-	-	-	-	14,9	10
8	73,9	-	85,1	9,08	5,07	4,12
9	65 69,6	7,9	57,1	4,1	3,48	2,73
10	-	-	-	-	NR	-
11	-	-	-	-	6,8	5,25
12	36,4 50,8	5,8	48,9	1,48	7,2	4
13	-	-	-	-	4,6	4,1
14	54,2	44,1	50	1,6	2,08	1,8
15	50 64,9	6,8	50	64,4	3,91	2,3

Tab. 4: Velocità di conduzione sensitiva (VCS) del nervo tibiale e ulnare, ampiezza del potenziale d'azione nervoso sensitivo (SNAP) e latenze dei cord dorsum (CD) nei cani testati. Celle più scure con numeri rossi = valori alterati; NR = Non Registrabile

Per quanto riguarda la valutazione degli autoanticorpi anti-gangliosidi, sebbene le indagini siano al momento in corso, risultati preliminari indicano che circa il 30% dei sieri da noi inviati sono risultati positivi per la presenza degli anticorpi.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio suggeriscono che l'ACP, in modo simile alla GBS (13), può essere classificata in differenti sottotipi sulla base delle caratteristiche elettrodiagnostiche. In particolare risulta che un 40% dei cani presentano dei caratteri di demielinizzazione che sovrastano il quadro di perdita assonale (gruppo AIDP). In alcuni soggetti inoltre, accanto al coinvolgimento assonale delle fibre motorie è presente un concomitante coinvolgimento delle fibre sensitive (gruppo AMSAN). I risultati ottenuti differiscono da alcune precedenti pubblicazioni in cui vengono riportate alterazioni prevalentemente assonali motorie nei cani affetti da ACP. Questa discrepanza potrebbe dipendere dall'utilizzo di differenti criteri di classificazione della polineuropatia. Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere legata all'influenza dell'antigene causativo sui diversi sottotipi: molti dei cani colpiti da ACP in Nord America hanno avuto contatti con la saliva di procione (antigene causativo); dal momento che i procioni non sono presenti nel nostro continente, devono essere presenti altri antigeni responsabili per le forme di ACP che noi vediamo.

Il differente aspetto patogenetico è probabilmente imputabile anche alla diversa composizione della nostra popolazione che vede inclusi cani di età più avanzata (media 9,1 anni) rispetto a quelli facenti parte di studi simili eseguiti negli Stati Uniti (media 5,9 anni).

E' interessante che anche nella GBS sia stata riscontrata una differente distribuzione geografica dei sottotipi con la forma demielinizzante (AIDP) nettamente più comune in Nord America ed Europa, mentre nel Nord della Cina, in Giappone, in Centro e Sud America le forme assonali (AMAN, AMSAN) rappresentano un 30-47% (15).

La determinazione di anticorpi anti-gangliosidi nel siero dei 29 cani oggetti del nostro studio è tuttora in corso; una valutazione preliminare riferisce che in circa un 30% dei campioni è stata evidenziata una positività agli anticorpi. Dei sieri "controllo" uno è risultato positivo.

Questi dati ci permettono di ottenere una diagnosi di certezza sulla natura autoimmune del processo patologico, almeno in quel 30% dei

casi risultati positivi. L'unica positività riscontrata nei 29 sieri "controllo" è da riferire ad un cane del canile municipale di Parma, la cui anamnesi, non disponibile, non permette di escludere che il soggetto sia stato affetto da poliradicoloneurite acuta.

In Medicina Umana, allo stesso modo, solo una parte dei pazienti affetti dalla GBS risulta positiva per la presenza di anticorpi anti-gangliosidi (AMAN, AMSAN, FISCHER) mentre non sono stati riscontrati anticorpi nel siero dei pazienti appartenenti al sottotipo demielinizzante (AIDP), gruppo numericamente più rappresentato (15).

La correlazione soggetto per soggetto della classificazione elettrodiagnostica con i risultati della ricerca degli anticorpi anti-gangliosidi, che sarà possibile quando la rielaborazione dei dati di laboratorio sarà terminata, permetterà di comprendere meglio quali analogie patogenetiche e cliniche sono presenti tra ACP e GBS.

Dai dati ottenuti emergono dei potenziali sviluppi di ricerca:

- la ricerca di una correlazione tra i sottotipi classificati dal punto di vista neurofisiologico e la positività sierologica dei campioni valutando se, come avviene per la GBS, il riscontro di autoanticorpi è assente esclusivamente nei sottotipi AIDP
- valutare se, sulla base della positività sierologica e della sottotipizzazione ottenuta, si può ottenere un indirizzo prognostico ed un'eventuale differenziazione nel protocollo terapeutico tra i vari sottotipi di ACP.

BIBLIOGRAFIA

1. Glass E. N., Kent M. : THE CLINICAL EXAMINATION FOR NEUROMUSCULAR DISEASE, Neuromuscular Disease, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Volume 32- Numero1- Gennaio 2002.
2. Bortolami R., Callegari E.: NEUROLOGIA ED ESTESIOLOGIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI, Edagricole, 1999 Pag. 111.
3. Nickel R., Shummer A., Seiferle E.: TRATTATO DI ANATOMIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI-SISTEMA NERVOSO, ghiandole ENDOCRINE, ORGANI DI SENSO, Cea, 1988 Pag. 200 e ss.
4. Aguggini G., Beghelli V., Clement M. G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L. F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: FISIOLOGIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI CON ELEMENTI DI ETOLOGIA, Utet, 1998 Pag. 109 e ss.
5. De Lahunta A.: NEUROANATOMIA E NEUROLOGIA CLINICA VETERINARIA, Elsevier, 2010 - Pag. 221 e ss.
6. De Lahunta A.: NEUROANATOMIA E NEUROLOGIA CLINICA VETERINARIA, Elsevier, 2010 - Pag. 78 e ss.
7. Bernardini M.: NEUROLOGIA DEL CANE E DEL GATTO, Poletto, 2004 Pag. 1 e ss.

8. Aguggini G., Beghelli V., Clement M. G., d'Angelo A., Debenedetti A., Facello C., Giulio L. F., Guglielmino R., Lucaroni A., Maffeo G., Marongiu A., Naitana S., Nuvoli P., Piazza R.: FISILOGIA DEGLI ANIMALI DOMESTICI CON ELEMENTI DI ETOLOGIA, Utet, 1998 Pag. 47 e ss.
9. Platt S. R., Olby N. J.: BSAVA MANUAL OF CANINE AND FELINE NEUROLOGY (Third Edition), Bsava, 2004 – Pag. 31 e ss.
10. Cuddon P. A.: ELECTROPHYSIOLOGY IN NEUROMUSCOLAR DISEASE, Neuromuscular Disease, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Volume 32- Numero1- Gennaio 2002
11. Cuddon P. A.: ACQUIRED CANINE PERIPHERAL NEUROPATHIES, Neuromuscular Disease, Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Volume 32- Numero1- Gennaio 2002
12. Cuddon Paul A.; ELECTROPHYSIOLOGIC ASSESSMENT OF ACUTE POLYRADICULONEUROPATHY IN DOGS: COMPARISON WITH GUILLAIN-BARRÈ SYNDROME IN PEOPLE, J Vet Intern Med 1998;12:294-303
13. Vucic S., Kiernan M. C., Cornbalth D. R.. GUILLAIN-BARRÈ SYNDROME: AN UPDATE, Journal of clinical neuro science 16 (2009) 733-741
14. Rinaldi S., Brennan K. M., Goodyear C. S., O'Leary C., Schiavo G., Crocker P. R., Willison H. J.: ANALYSIS OF LECTIN BINDING TO GLYCOLIPID COMPLEXES USING COMBINATORIAL GLYCOARRAYS, Glycobiology vol. 19 no. 7 pp 789-796, 2009
15. Hughes R. A., Cornblath D. R.: GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME, Lancet 2005; 366:1653-66