

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Scienze Cliniche Veterinarie
Ciclo XXV**

Settore Concorsuale di afferenza: 07 H4

Settore Scientifico disciplinare: VET 08

TITOLO TESI

**CARATTERIZZAZIONE CLINICA, EZIOPATOGENETICA E
RICERCA DI MARKER DIAGNOSTICI NELLA
POLIRADICOLONEURITE ACUTA IDIOPATICA DEL CANE**

Presentata da: Dott.ssa Antonella Gallucci

Coordinatore Dottorato

Prof. Paolo Famigli Bergamini

Relatore

Prof. Gualtiero Gandini

Esame finale anno 2013

RIASSUNTO

La poliradicoloneurite acuta idiopatica (ACIP) è una patologia infiammatoria che interessa le radici di più nervi spinali, descritta soprattutto nel cane, più raramente nel gatto, caratterizzata da insorgenza acuta di paresi/paralisi flaccida. L'ACIP mostra notevoli similitudini con la sindrome di Guillan-Barrè dell'uomo (GBS), in cui la patogenesi è su base autoimmunitaria ed è stata correlata con la presenza di alcuni fattori scatenanti (trigger).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare l'ACIP in 26 cani, descrivendone la sintomatologia, l'evoluzione clinica, i risultati degli esami diagnostici.

La diagnosi si è basata sui riscontri dell'anamnesi, della visita neurologica e del decorso confermata, quando possibile, dai rilievi elettrodiagnostici.

Su tutti i cani è stata valutata l'esposizione a specifici agenti infettivi (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*), o altri fattori (come vaccinazioni) che potrebbero aver agito da "trigger" per l'instaurarsi della patologia; sull'intera popolazione e su 19 cani non neurologici (gruppo di controllo), si è proceduto alla ricerca degli anticorpi anti-gangliosidi.

La sintomatologia di più frequente riscontro (25/26) ha coinvolto la funzione motoria (paresi/plegia) con prevalente interessamento dei 4 arti (24/25). Sei cani hanno ricevuto una terapia farmacologica, che non ne ha influenzato il decorso, favorevole in 24/26 casi.

In 9 pazienti è stata rilevata una precedente esposizione a potenziali trigger; in 10 casi si è riscontrato un titolo anticorpale positivo ad almeno un agente infettivo testato. In 17/26 cani si è ottenuto un titolo anticorpale anti-GM2 e anti-GA1; nella popolazione di controllo solo un caso è risultato positivo.

Questi risultati hanno contribuito a consolidare le conoscenze di questa patologia, validando l'utilità della ricerca anticorpale anti-gangliosidica per la diagnosi di ACIP e facendo intravedere la possibilità che l'ACIP possa essere assimilata alla

GBS anche dal punto di vista patogenetico, per la quale potrebbe essere considerata come modello animale spontaneo.

INDICE

RIASSUNTO	2
------------------------	---

CAPITOLO 1

RICHIAMI DI ANATOMIA FUNZIONALE DEL SISTEMA

<i>NERVOSO PERIFERICO</i>	8
---------------------------------	---

1.1 ANATOMIA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO.....	8
--	---

1.1.1 STRUTTURA DEL NERVO PERIFERICO.....	14
---	----

1.1.2 GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE.....	15
-------------------------------------	----

1.1.3 MUSCOLO SCHELETRICO.....	16
--------------------------------	----

CAPITOLO 2

ASPETTI CLINICI DELLE SINDROMI NEUROMUSCOLARI

2.1 L'ESAME NEUROLOGICO	17
-------------------------------	----

2.2 LE DIAGNOSI DIFFERENZIALI	22
-------------------------------------	----

2.3 LE INDAGINI COLLATERALI	23
-----------------------------------	----

CAPITOLO 3

LA POLIRADICOLONEURITE ACUTA IDIOPATICA CANINA

3.1 INTRODUZIONE ED EZIOPATOGENESI.....	32
---	----

3.2 PRESENTAZIONE CLINICA.....	34
--------------------------------	----

3.3 COMPARAZIONE CON LA SINDROME DI GUILLAIN-BARRE' UMANA	37
3.4 DIAGNOSI	40
3.5 PROGNOSI E TERAPIA.....	42

PARTE SPERIMENTALE.....	44
--------------------------------	-----------

CAPITOLO 4

OBIETTIVI DEL LAVORO E CRITERI DI INCLUSIONE

4.1 PREMESSA.....	45
4.2 OBIETTIVI.....	46
4.3 SELEZIONE DELLA POPOLAZIONE: CRITERI DI INCLUSIONE.....	47

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 CASI CLINICI.....	49
5.2 INDAGINI COLLATERALI AGGIUNTIVE.....	50
5.3 INDAGINI SIEROLOGICHE.....	52
5.4 MARKER DIAGNOSTICI.....	52
5.5 INDAGINE STATISTICA.....	53

CAPITOLO 6

RISULTATI

6.1 RISULTATI.....	55
6.1.1 SEGNALAMENTO.....	55
6.1.2 ANAMNESI.....	57
6.1.3 ESAME OBIETTIVO GENERALE.....	61
6.1.4 ESAME NEUROLOGICO.....	61
6.1.5 TERAPIA.....	62
6.1.6 DECORSO.....	63
6.2 DETERMINAZIONE TITOLI ANTICORPALI DI AGENTI INFETTIVI.....	63
6.3 INDAGINE ELETTRODIAGNOSTICA.....	64
6.4 INDAGINE ISTOPATOLOGICA: BIOPSIA MUSCOLARE.....	67
6.5 ESAME DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE.....	68
6.6 ANALISI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI GM2 E GA1	68
6.4 INDAGINE STATISTICA.....	71
6.5 GRUPPO DI CONTROLLO.....	72

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE.....	73
7.1 ASPETTI CLINICI.....	73
7.2 ASPETTI DIAGNOSTICI.....	82
7.3 ANALISI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI GM2 E GA1.....	85
7.4 CONCLUSIONI.....	87

BIBLIOGRAFIA.....	89
-------------------	----

CAPITOLO 1

RICHIAMI DI ANATOMIA FUNZIONALE DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

1.1 ANATOMIA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Da un punto di vista strutturale, il sistema nervoso (SN) viene primariamente distinto in una parte centrale (SNC), composta dall'**encefalo** e dal **midollo spinale**, e in una parte periferica e muscolare, che comprende i nervi, la placca neuro-muscolare e i

muscoli, denominata **sistema nervoso periferico** (SNP). Da un punto di vista anatomo-funzionale, si individua il **sistema neuromuscolare**, che risulta costituito dall'insieme delle unità motorie, ovvero dai Motoneuroni Inferiori (MNI) del corno ventrale della sostanza grigia del midollo spinale, dalle radici ventrali dei nervi spinali, dai nervi spinali, dai nervi periferici corrispondenti, dalle placche neuro-muscolari e dai muscoli. Non esiste un confine anatomofunzionale netto tra il SNC e il SNP, in quanto quest'ultimo si continua dalle strutture neuroassiali alle radici nervose e poi ai nervi cranici e spinali senza soluzioni di continuo. Convenzionalmente, le radici dei nervi spinali e i gangli spinali sensitivi fanno parte del SNP (De Lahunta, 2009, Barone 2012, Bernardini 2010).

Prima di descrivere in maniera dettagliata le componenti del sistema nervoso, è opportuno richiamare brevemente la tipologia delle cellule che lo compongono.

Il **neurone** e gli elementi di supporto, quali la glia e l'ependima, rappresentano le cellule primarie funzionali del SN (De Lahunta, 2009). Il neurone è una cellula altamente specializzata costituita da un corpo (*pirenoforo o soma*), contenente il nucleo e la maggior parte degli organuli, da un prolungamento composto da neurofilamenti, più o meno lungo e solitamente unico, chiamato *assone*, e da diversi processi, spesso numerosi e molteplici, denominati *dendriti*; in questi ultimi vi si colloca una porzione recettoriale, in cui gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno o interno vengono convertiti in impulsi nel neurone. L'assone decorre dalla zona dendritica fino alla porzione terminale neuronale, denominata telodendron, a livello del quale l'impulso lascia il neurone per essere trasmesso ad un altro neurone o all'organo effettore (De Lahunta, 2009). A seconda del posizionamento di tali componenti, è possibile distinguere il neurone in unipolare, bipolare, pseudo unipolare, multipolare (Bernardini, 2010).

Esistono diversi tipi di neuroni, ma per gli obiettivi del presente lavoro, è sufficiente menzionare la distinzione tra i neuroni sensitivi e quelli motori. I neuroni sensitivi (o

afferenti) convogliano gli stimoli dalla periferia al SNC, mentre in quelli motori (o efferenti), lo stimolo viaggia in senso opposto. La peculiarità dei primi è quella di presentare delle terminazioni nervose modificate e specializzate per la raccolta di stimolazioni termiche, meccaniche, nocive. I neuroni motori (motoneuroni inferiori) hanno il pirenoforo localizzato nel SNC, mentre l'assone può decorrere nel SNP, formando il nervo periferico e collegando il SN con gli organi effettori. I neuroni motori più importanti sono gli alfa e i gamma motoneuroni, destinati rispettivamente alle fibre muscolari extrafusali e intrafusali.

Eccitabilità neuronale - I neuroni hanno una differenza di potenziale tra l'interno e l'esterno della membrana citoplasmatica di circa -70 mV a riposo, legata soprattutto alla presenza di una diversa distribuzione di ioni tra l'ambiente intracellulare ed extracellulare. Quando un assone viene stimolato, si assiste ad un ingresso per lo più di ioni sodio (Na^+) che rendono positivo l'interno della cellula, in un limitato tratto di membrana cellulare (+35 mV). Questa alterazione della differenza di potenziale, che si traduce in un cambio di polarità, prende il nome di potenziale d'azione (De Lahunta 2009, Bernardini 2010).

La **cellula di Schwann** (*neurolemmocita*) è la cellula gliale che avvolgendosi attorno agli assoni, isola e protegge il nervo con cui crea un'intima connessione. E' preposta alla produzione di mielina nel SNP, necessaria per la rapida propagazione dell'impulso nervoso lungo gli assoni, e interviene nei processi di riparazione e rigenerazione del nervo danneggiato. Le cellule di Schwann che non producono mielina, rivestono invece gli assoni non mielinizzati. Tra le altre funzioni, vi sono quelle di sostegno e trofismo per il neurone, produzione della matrice extracellulare del nervo, modulazione dell'attività sinaptica neuromuscolare e presentazione degli antigeni ai linfociti-T.

I nervi cranici sono 12 paia (Tabella 1) e i loro nuclei si trovano per la maggior parte a livello del mesencefalo, ponte e midollo allungato, ad eccezione del primo che origina a livello della mucosa olfattoria (Nervo Olfattorio) e del secondo che origina dalla retina (Nervo Ottico).

Tabella 1: Nervi Cranici

I	Nervo Olfattorio
II	Nervo Ottico
III	Nervo Oculomotore
IV	Nervo trocleare
V	Nervo Trigemino
VI	Nervo Abducente
VII	Nervo Facciale
VIII	Nervo Vestibolo-Cocleare
IX	Nervo Glossofaringeo
X	Nervo Vago
XI	Nervo Accessorio
XII	Nervo Ipoglosso

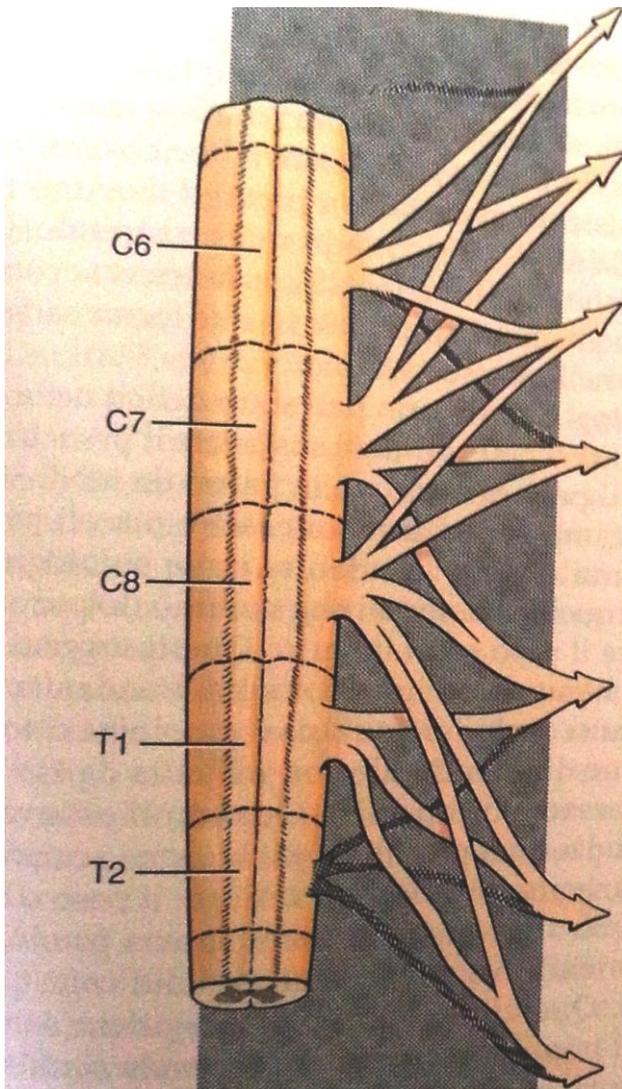
I nervi spinali sono dei nervi misti che contengono sia fibre ascendenti (afferenti), in cui viaggiano gli impulsi sensitivi e fibre discendenti (efferenti) in cui viaggiano quelli motori.

Emergono dal midollo spinale tramite due radici, una ventrale che è costituita dalle fibre efferenti motorie, e una dorsale che comprende il ganglio spinale ed è costituita dalle fibre afferenti sensitive. Le fibre afferenti sono divise in una porzione che, partendo dalle strutture periferiche innervate si rende ai somi contenuti nel ganglio spinale, e in una porzione che dal ganglio si porta in direzione centripeta verso il midollo spinale, costituendo la radice dorsale le cui fibre, a loro volta, penetrano nei funicoli dorsali e laterali.

Le fibre efferenti hanno invece il pirenoforo all'interno della sostanza grigia ventrale del midollo spinale (corna ventrali).

A livello del forame intervertebrale, le due radici si uniscono andando a formare il nervo spinale. I nervi spinali sono deputati all'innervazione del collo, tronco e arti. In particolare, i nervi che originano a livello dell'intumescenza cervico-toracica, ovvero nella parte compresa tra il sesto segmento midollare cervicale e il secondo toracico, vanno a costituire il plesso brachiale, ovvero l'intreccio delle porzioni ventrali dei nervi spinali dei segmenti midollari inclusi tra la sesta vertebra cervicale e la seconda toracica (C6-T2) (Fig.1 Nervi plesso brachiale), da cui si dipartono i nervi destinati all'innervazione dell'arto anteriore. In corrispondenza dell'intumescenza lombo-sacrale, ovvero nel tratto compreso tra il quarto segmento lombare e il primo sacrale (L4-S1), originano invece i nervi preposti per l'innervazione dell'arto posteriore (plesso lombo-sacrale, Fig. 2).

Fig. 1 – Plesso Brachiale (de Lahunta, 2009)



Nervo Sovrascapolare (C5) C6 C7

Nervo Sottoscapolare C6 C7

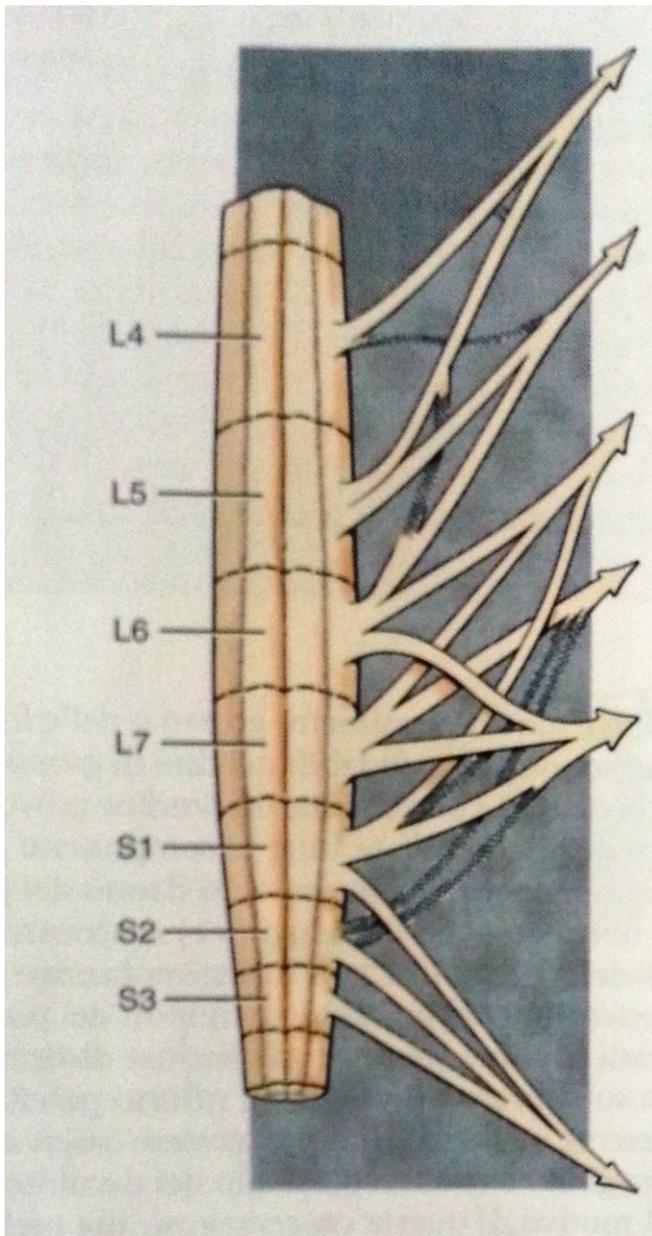
Nervo Muscolocutaneo C6 C7 C8

Nervo Ascellare (C6) C7 C8

Nervo Radiale C7 C8 T1 (T2)

Nervo Mediano C8 T1 (T2)

Nervo Ulnare C8 T1 (T2)

Fig. 2 - Plesso Lombo-sacrale (de Lahunta, 2009)

Nervo Femorale L4 L5 L6

Nervo Otturatore (L4) L5 L6

Nervo Gluteo Craniale L6 L7 S1

Nervo Gluteo Caudale L7 (S1 S2)

Nervo Ischiatico L6 L7 S1 (S2)

Nervo Pudendo S1 S2 S3

I nervi spinali di un determinato segmento midollare, non fuoriescono necessariamente allo stesso livello della vertebra corrispondente. Nel tratto cervicale, considerato che il primo paio di nervi cranici fuoriesce attraverso due fori della lamina dell'atlante, la coppia di nervi spinali di un determinato segmento, esce cranialmente alla vertebra corrispondente. Occorre però ricordare che in virtù della presenza dell'ottavo segmento midollare, l'ottavo paio di nervi spinali, emerge tra la settima vertebra cervicale e la prima toracica. Da qui in poi la coppia di nervi spinali emerge

caudalmente alla vertebra corrispondente. Si rammenta che nella porzione caudale lombare, si osserva una marcata riduzione in lunghezza dei segmenti midollari, che trova la massima espressione nei cani di grossa taglia, dove all'interno del canale della quarta vertebra lombare, sono contenuti i tre segmenti midollari sacrali. In linea generale si può affermare che nel cane di piccola e media taglia, il midollo spinale termina in corrispondenza della sesta vertebra lombare mentre nel gatto, prosegue invece fino alla settima vertebra lombare (de Lahunta, 2009). A questo livello i nervi spinali decorrono pertanto in senso caudale all'interno del canale vertebrale, per emergere caudalmente alla vertebra corrispondente.

STRUTTURA DEL NERVO PERIFERICO - Il nervo è costituito dall'insieme delle fibre assonali, che si presentano per la maggior parte ricoperti da una guaina mielinica. La mielina è prodotta da cellule gliali specifiche, i neurolemmociti, conosciuti in passato come cellule di Schwann (Barone, 2012), che contrariamente agli oligodendrociti, ovvero le cellule gliali preposte alla produzione della mielina nel SNC, restano a contatto con le fibre nervose, formando un sottile involucro citoplasmatico, denominato neurilemma (conosciuto in passato come guaina di Schwann). La mielina non circonda con continuità l'assone: esistono dei brevi tratti senza mielina, al confine tra un segmento prodotto da una cellula di Schwann e quello prodotto da un'altra, denominate "Nodi di Ranvier", lunghi 1 micron. Il tratto nervoso compreso tra due nodi viene denominato invece internodo ed è lungo circa 1 mm. La guaina si comporta da isolante e si continua dall'emergenza del nervo fino alla sua terminazione. Il potenziale d'azione, ovvero il cambio di polarità che si verifica in un'area limitata della membrana neuronale come ricordato in precedenza, può pertanto manifestarsi solo nei nodi di Ranvier, a causa delle proprietà isolanti della mielina, per cui lo stimolo salta da un nodo all'altro, creando la cosiddetta *conduzione saltatoria*, che permette un notevole aumento della velocità nella propagazione dell'impulso nervoso (King, 1987; Bernardini, 2010).

Le fibre nervose si raggruppano in fasci nervosi che vengono delimitati da una sottile guaina connettivale che ha funzione di sostegno e prende il nome di perinervio (perinevrio o perinevro). Dal suo versante interno si diparte una sottile rete di fibre collagene, che funge da barriera formando un sottile involucro al neurolemmocita e prende il nome di endonervio (endonevro). (Barone, 2012).

I fasci nervosi vengono invece avvolti un tessuto connettivale meno denso del precedente, denominato epinervio (epinevro), che conferisce al nervo la flessibilità e la resistenza meccanica, provvedendo prevalentemente ad una funzione protettiva e continuandosi con la dura madre della radice nervosa.

Il motoneurone inferiore (MNI) è il neurone efferente del SNP che mette in connessione il SNC con la muscolatura innervata. Il MNI si compone di due sistemi: l'efferente somatico generale (ESG), che comprende i neuroni che innervano la muscolatura striata, e l'efferente viscerale generale (EVG), che innerva la muscolatura liscia associata ai vasi sanguigni, alle strutture viscerali, alle ghiandole e alla muscolatura cardiaca.

A livello della muscolatura striata, ogni neurone si divide in varie diramazioni, ciascuna delle quali termina in una fibra muscolare a livello della placca neuromuscolare (De Lahunta, 2009). Ai fini del presente lavoro, non si procederà alla descrizione del sistema viscerale efferente generale, per la cui trattazione si rimanda ai testi specifici.

GIUNZIONE NEUROMUSCOLARE - Nell'adulto ogni fibra muscolare risulta innervata da una diramazione dell'assone di un singolo motoneurone, in grado di innervare un numero variabile di fibre muscolari. Il numero dei sincizi muscolari innervati da un singolo motoneurone è chiamata unità motoria. I muscoli coinvolti in funzioni che richiedono notevole coordinazione sono innervati da motoneuroni con unità motorie costituite da poche fibre per neurone (come avviene ad esempio nella muscolatura extraoculare in cui l'unità motoria è costituita da soli 3-4 fibre muscolari

per neurone), mentre nella muscolatura coinvolta in funzioni più grossolane, ad esempio quella destinata agli arti pelvici, si osservano unità motorie composte da 100-150 cellule muscolari per neurone. La forza relativa della contrazione muscolare dipende dal numero delle unità motorie attivate in un muscolo.

Nel muscolo la porzione distale dell'assone, che a questo livello è privo di mielina, termina attraverso diverse branche, in un'area modificata e specializzata del sarcolemma, in prossimità della sua porzione longitudinale centrale, denominata giunzione neuromuscolare o sinapsi. Qui l'endonervio entra in continuità con l'endomysio muscolare. La terminazione assonale contiene numerosi mitocondri e vescicole sinaptiche, che rappresentano la fonte del neurotrasmettitore acetilcolina (ACh). La membrana cellulare di tale area prende il nome di membrana pre-sinaptica, mentre la porzione del sarcolemma delle fibre muscolari è chiamata membrana post-sinaptica ed è rappresentata da numerose invaginazioni che formano delle pieghe denominate fessure sub neurali; tali invaginazioni hanno lo scopo di incrementare la superficie muscolare e sono ricche in recettori per l'ACh, i quali vanno a formare i canali per gli ioni sodio (De Lahunta, 2009; King, 1987).

MUSCOLO SCHELETRICO - Analogamente alla struttura del nervo, anche all'interno del muscolo è possibile osservare la presenza di tessuto connettivale. Partendo dall'interno si riscontra la presenza dell'endomysio, che circonda le singole fibre muscolari. Le fibre si raggruppano a formare dei fascicoli avvolte dal perimisio mentre, esternamente, la contiguità del fascio muscolare con tendini, aponeurosi ed osso, è garantita dall'epimisio. Le fibre muscolari hanno un diametro compreso tra i 20 e i 50 μm , una lunghezza fino a 10 cm e contengono dei miofilamenti contrattili chiamati miofibrille. Sono multinucleate (sincizi) e circondate dal sarcolemma. Al loro interno, precisamente ancorati in parallelo all'endomysio, sono presenti delle strutture muscolari particolari denominate fusi muscolari, la cui funzione principale è quella di partecipare al mantenimento del tono muscolare e all'esecuzione dei movimenti armonici durante la deambulazione (King 1987; Barone, 2012).

CAPITOLO 2

ASPETTI CLINICI DELLE SINDROMI NEUROMUSCOLARI

2.1 L'ESAME NEUROLOGICO (Glass e Kent, 2002)

Dal punto di vista clinico è spesso complesso differenziare un problema localizzato ai nervi periferici da uno a carico dei muscoli, o ancora da uno che coinvolga selettivamente il soma del motoneurone inferiore dei nervi spinali. Per tali motivi, in virtù della predominanza in medicina veterinaria di malattie del SNP che interessano soprattutto la sua sola componente efferente, si preferisce parlare di *sindrome neuromuscolare*, definendo e raggruppando in questo termine gli effetti di qualsiasi malattia che può compromettere le diverse componenti del sistema neuromuscolare (definito anche “sistema del motoneurone inferiore”), ovvero il motoneurone inferiore del corno ventrale del midollo spinale, le radici ventrali dei nervi spinali, i nervi spinali, i nervi periferici corrispondenti, le placche neuro-muscolari e i muscoli.

Il paziente affetto da una sindrome neuromuscolare, può manifestare una sintomatologia clinica molto variabile, in relazione alla causa scatenante, alla severità delle lesioni e alle modalità di progressione della noxa patogena. Talvolta può essere difficile individuare la reale estensione dei deficit neurologici, in quanto l'evidenza clinica di una sindrome neuropatica periferica, rimasta a livelli subclinici in alcuni distretti, potrebbe non corrispondere alla reale diffusione del problema. Così ad esempio in una polineuropatia, possono osservarsi disfunzioni evidenti a carico dei soli arti posteriori.

Di norma, nelle forme generalizzate si assiste ad una sintomatologia che coinvolge l'intero organismo, con deficit neurologici diffusi e generalmente simmetrici. Come precedentemente accennato, le disfunzioni interessano soprattutto le fibre efferenti, con un danno selettivo della componente motoria.

Pertanto, gli elementi chiave della visita neurologica per individuare una sindrome neuromuscolare, saranno quelli relativi all'esame delle seguenti voci dell'esame obiettivo particolare dell'apparato nervoso:

- Andatura
- Riflessi spinali
- Tono e trofismo muscolare

Di seguito, vengono rapidamente descritte le alterazioni comunemente osservate durante la valutazione neurologica di un paziente affetto da sindrome neuromuscolare (Cuddon, 2012; Braund, 2003; de Lahunta, 2009; Vite, 2003):

STATO DEL SENSORIO; COMPORTAMENTO - Di norma non si rilevano particolari alterazioni delle prime due voci dell'esame neurologico, ad eccezione dei casi in cui la sindrome neuromuscolare è secondaria ad un processo metabolico o a una complicazione sistemica (come nel caso di un diabete mellito in chetoacidosi o di una polmonite ab ingestis) che possono alterare lo stato del sensorio.

POSTURA – Con l'aumentare della gravità della sintomatologia, si può assistere all'incapacità nel mantenimento della stazione quadrupedale, con tendenza verso il decubito, che può diventare sternale fino a quello laterale nei casi più severi.

ESAME DELL'ANDATURA – Come ricordato in precedenza, nell'ambito delle sindromi neuromuscolari, le disfunzioni interessano soprattutto le fibre efferenti, quindi selettivamente la componente motoria; di conseguenza i segni clinici evidenzieranno quasi sempre una disfunzione della normale locomozione, che si presenta inadeguata nel sopportare un normale grado di attività muscolare, manifestando come disfunzione principale la **debolezza** (paresi fino alla paralisi/plegia) e l'**intolleranza all'esercizio**. Si può rilevare la presenza di passi più corti e di ampiezza inferiore al normale (ipometria), con maggiore flessione delle giunture che si possono rendere più o meno evidenti attraverso il riscontro di plantigradia e palmigradia. Di norma non si evidenzia la presenza di atassia. In alcuni

casi all'esame dell'andatura è possibile osservare un certo grado di incoordinazione, che viene intesa come effetto della debolezza del soggetto piuttosto che come danno primario propriocettivo. Solo di rado si assiste ad un coinvolgimento delle fibre ascendenti, che convogliano verso il Sistema Nervoso Centrale le informazioni estero- e propriocettive, causando pertanto una reale atassia sensoriale, intesa come disfunzione della componente ascendente del SNP.

PROPRIOCEZIONE E REAZIONI POSTURALI – Con riferimento a quanto prima riportato, il deficit motorio può essere espresso con una debolezza tale da rendere deficitarie anche le reazioni posturali, a testimonianza di un'impossibilità o difficoltà nell'esecuzione di una corretta risposta motoria a tali test.

ESAME DEI RIFLESSI SPINALI – Nelle presentazioni classiche, salvo in alcune forme, i riflessi spinali si presentano uniformemente diminuiti o addirittura assenti in virtù della mancata integrità della componente motoria dell'arco riflesso spinale.

Nel caso di miopatie generalizzate o patologie della giunzione neuromuscolare, in genere non si notano deficit propriocettivi e alterazioni dell'attività riflessa. Talvolta è però possibile evidenziare nelle forme più severe di miastenia gravis, la tendenza alla diminuzione di intensità dei riflessi spinali durante l'esecuzione della prova.

ESAME DEI NERVI CRANICI - i nervi cranici possono essere coinvolti in una sindrome periferica, ma con una frequenza inferiore rispetto ai nervi spinali (Cuddon, 2002). Di solito quelli maggiormente interessati sono il nervo trigemino, il facciale e il vago, pertanto la sintomatologia sarà l'espressione della disfunzione del nervo coinvolto.

TONO E TROFISMO MUSCOLARE - Il normale tono e trofismo muscolare sono garantiti da una stimolazione costante da parte dell'attività del MNI che innerva la muscolatura striata come visto in precedenza; quando tale funzione diventa deficitaria, come avviene tipicamente in una sindrome neuromuscolare, si evidenzierà una

conseguente ipotonia/atonìa e ipotrofia muscolare generalizzata precoce, di tipo neurogeno.

2.2 DIAGNOSI DIFFERENZIALI (Cuddon, 2002)

Per la rappresentazione schematica delle possibili diagnosi eziologiche di un problema neurologico, si utilizza l'acronimo del VITAMIN D. Si sottolinea che, in virtù del tema trattato dal presente lavoro, che nello specifico contempla la descrizione di una poliradiculoneurite, per brevità si focalizzerà di seguito l'attenzione sulle diagnosi differenziali in corso di polineuropatie e poliradiculopatie, tralasciando le altre cause di sindrome neuromuscolare:

- patologie vascolari (**V**): nessuna
- infiammatorie infettive (**I**): poliradiculoneurite da toxoplasmosi/neosporosi; malattie immunomediate
- traumatiche (**T**): nessuna
- anomalo/congenite (**A**): nessuna
- metaboliche (**M**): malattie endocrine, carenziali, tossiche
- idiopatiche (**I**): poliradiculoneurite idiopatica
- neoplastiche (**N**): sindromi paraneoplastiche, insulinooma
- degenerative (**D**): malattie da accumulo (ereditarie)

Come per le altre sindromi neurologiche, anche in quelle neuromuscolari, quindi per le polineuropatie/poliradiculopatie, l'anamnesi riveste un ruolo chiave nello stilare la lista delle possibili diagnosi differenziali. Di fondamentale importanza è il tipo di insorgenza dei segni clinici, che di base può essere di tipo acuto o cronico. Possiamo infatti differenziare:

- Polineuropatie/poliradiculoneuriti ad eziologia **ACUTA**, rappresentate essenzialmente dalla:

- Poliradicoloneurite idiopatica acuta
- Polineuropatie/poliradicoloneuriti ad eziologia **CRONICA**, rappresentate essenzialmente da:
 - Endocrinopatie (Ipotiroidismo, diabete mellito, insulinoma o tumori secernenti fattori simili all'insulina)
 - Malattie metaboliche (iperossaluria nel gatto)
 - Tossicosi (tossicità da vincristina, da cisplatino, intossicazione da organo fosforici)
 - Forme infettive (toxoplasmosi, neosporosi)
 - Forme immunomediate (poliradicoloneurite cronica demielinizzante recidivante, degenerazione assonale cronica)
 - Forme idiopatiche (polineuropatia da denervazione distale)
 - Forme paraneoplastiche (associate principalmente a carcinomi mammari e polmonari, linfomi, melanomi, mastocitomi, melanomi)
 - Forme degenerative ereditarie (patologie da accumulo)

Sulla base di quanto appena illustrato, potrebbe apparire semplice diagnosticare una poliradicoloneurite idiopatica acuta sulla base della sola sintomatologia clinica e delle modalità di insorgenza. In realtà non di rado alcune forme croniche possono avere un'insorgenza più acuta e soprattutto non sempre è possibile distinguere una lesione polineuropatica da una muscolare o della giunzione della placca neuromuscolare. Si ricorda infatti che la miastenia gravis nella sua forma fulminante e il botulismo, possono mimare i segni di una poliradicoloneurite idiopatica acuta e vanno pertanto posti in diagnosi differenziale ogni qualvolta vi sia una compatibilità anamnestica e clinica.

2.3 LE INDAGINI COLLATERALI (Vite, 2003, Glass e Kent, 2002, Cuddon 2002, Dickinson PJ e LeCouteur RA, 2002)

Tra i test diagnostici di routine, quelli di maggiore utilità nelle sindromi neuromuscolari includono un esame emocromocitometrico, un profilo biochimico completo che includa i valori di creatinfosfochinasi (CPK), l'esame della funzionalità tiroidea nei pazienti di età superiore ai 5 anni e l'esame urine. Spesso tali indagini non permettono di ottenere una diagnosi definitiva in corso di forme idiopatiche o infettive, però permettono di escludere altre patologie in grado di causare una malattia neuromuscolare, come ad esempio l'ipotiroidismo, la neuropatia diabetica, la miopatia ipokaliemica e così via. Il rilievo di notevoli aumenti della CPK, permette di orientare il clinico verso un coinvolgimento primario della componente muscolare rispetto a quella nervosa, seppure occorra sempre ricordare che moderati innalzamenti della CPK si possono notare anche in corso di cachessia, malattie cardiache e così via.

Quando si sospetta una forma infettiva, la sierologia può essere di aiuto nella diagnosi, sebbene il riscontro positivo di un titolo anticorpale (IgM e IgG), potrebbe non indicare la presenza di malattia in atto, poiché un determinato titolo di IgG può rimanere elevato per molti mesi nel siero, testimoniando pertanto solo una pregressa esposizione all'agente infettivo o una cronicizzazione della patologia. La concomitante presenza di IgM sierologiche o il successivo innalzamento delle IgG (siero conversione), possono essere di maggiore aiuto nella diagnosi. Si ricorda inoltre la possibilità di utilizzare indagini molecolari, quali PCR, per la ricerca diretta dell'agente patogeno nei substrati biologici.

La radiografia del torace permette di evidenziare o meno la presenza di un megaesofago e così come l'esame ecografico dell'addome, si rende necessario ogni qualvolta venga sospettata una patologia neoplastica.

Per lo scopo del presente lavoro, verranno approfondite di seguito solo le procedure diagnostiche che sono di maggiore ausilio nella diagnosi della poliradicoloneurite

idiopatica acuta del cane, ovvero verranno illustrate le procedure e le considerazioni relative all'interpretazione delle indagini elettrodiagnostiche, della biopsia neuromuscolare, dell'esame del liquido cerebrospinale. Le alterazioni specifiche che si rilevano in corso di poliradicoloneurite acuta idiopatica, verranno invece descritte in maniera dettagliata nel terzo capitolo, dedicato alla trattazione completa di tale malattia.

Indagini collaterali nella poliradicoloneurite acuta idiopatica del cane

Esami ematobiochimici e delle urine – In corso di poliradicoloneurite acuta idiopatica acuta, gli esami ematobiochimici e delle urine non evidenziano alterazioni particolari, ad eccezione dell'elettroforesi delle proteine sieriche, che può mostrare un innalzamento delle IgG.

Radiografia del torace - può essere utile per evidenziare la presenza di megaesofago, che solo di rado si accompagna alla poliradicoloneurite idiopatica.

Indagine elettrodiagnostica - riveste un ruolo di primaria importanza per lo studio di questo tipo di patologia, in quanto è in grado di fornire informazioni di natura funzionale sullo stato del sistema neuromuscolare.

Tale indagine diagnostica si compone di diversi test, tra cui, per lo scopo di tale tesi, verranno descritti l'esame Elettromiografico (EMG) gli Studi di Conduzione Nervosa, le onde F.

Da un punto di vista fisiopatogenetico, le lesioni del nervo periferico possono essere raggruppate in due principali categorie: la **degenerazione assonale** e la **demielinizzazione**. Nel primo caso rientrano tutte le patologie che possono provocare la perdita (anatomica o funzionale) di assoni e quindi denervazione a carico di un muscolo o di un gruppo muscolare. Al secondo caso appartengono le patologie che determinano un'alterazione del rivestimento mielinico che può essere diffuso a tutto il nervo o focale.

Sia la forma assonale che quella demielinizzante, si presentano con i medesimi segni clinici (debolezza e paresi), apparendo pertanto quasi indistinguibili. Risultano invece notevolmente diverse da un punto di vista elettrodiagnostico e prognostico. Di seguito verranno brevemente introdotti i principali test elettrodiagnostici.

- **Elettromiografia (EMG):**

Il test EMG ad ago concentrico ha grande sensibilità nello svelare i fenomeni di denervazione muscolare, e fornisce informazioni di primaria importanza sulla funzionalità dell'Unità Motoria e sulle patologie primarie del muscolo stesso. Si esegue solitamente sull'animale in anestesia generale inserendo un ago di registrazione in diversi punti e a diverse profondità nel ventre muscolare che si vuole indagare. Gli unici potenziali che si registrano in un soggetto normale sono il potenziale d'inserzione che è dovuto alla stimolazione meccanica dell'ago sulle fibrocellule muscolari, e i potenziali e il rumore di placca, che si registrano in prossimità della placca neuromuscolare

Prendendo in considerazione le principali alterazioni evidenziate in corso di poliradiculoneurite acuta idopatica canina, con tale esame è possibile osservare a livello muscolare delle attività elettriche patologiche conosciute come *Potenziali di Fibrillazione* e *Onde Positive a fronte ripido* (o *Onde Lente Positive a Fronte Ripido*), legate all'attivazione spontanea di singole fibrocellule muscolari rese ipersensibili all'acetilcolina a causa, nel caso dell'ACIP, della denervazione.

Studi di conduzione nervosa:

Questo gruppo di test consente di valutare in modo obiettivo la funzionalità delle componenti motorie e sensitive dei nervi periferici. Si basano sull'impiego di stimoli elettrici che, depolarizzando il nervo, inducono la

comparsa di un impulso elettrico nelle fibre nervose componenti il nervo. Per ogni stimolazione si effettua la registrazione del potenziale d'azione muscolare composito (CMAP) a livello di un muscolo innervato dal nervo testato nel caso delle fibre motorie, e del potenziale d'azione nervoso sensitivo (SNAP) nello stesso nervo nel caso delle fibre sensitive.

Per quanto riguarda la conduzione nervosa motoria:

i nervi più comunemente utilizzati sono l'ulnare, il radiale e più di rado il mediano per l'arto anteriore e il peroneo e il tibiale per l'arto posteriore.

I parametri più comunemente presi in considerazione sono:

- **Latenza del CMAP**, che è il tempo di conduzione delle fibre nervose più veloci.
- **Ampiezza e area del CMAP**, che dipendono dal numero di assoni reclutati.
- **Velocità di Conduzione Nervosa Motoria (MNCV)**: che si calcola in metri al secondo (m/sec) attraverso il rapporto tra la distanza (espressa in millimetri) tra i punti di stimolazione, e la differenza tra la latenza distale e quella prossimale.

Si ricorda che esistono importanti fattori fisiologici da prendere in considerazione ai fini di una corretta interpretazione della conduzione nervosa motoria, tra cui i più importanti sono l'età, la taglia e la temperatura corporea dell'animale testato.

- **Conduzione nervosa sensitiva:**

Gli studi di conduzione nervosa sensitiva permettono di valutare la funzionalità delle fibre nervose sensitive contenute nei nervi sensitivi e misti. I nervi comunemente valutati nel cane e nel gatto sono, tra i sensitivi, il

radiale superficiale laterale, il peroneo superficiale, il safeno, e, tra i misti, il tibiale e l'ulnare.

I Parametri che rivestono una maggiore utilità clinica sono:

- **Latenza del SNAP**, che indica il tempo di conduzione delle fibre nervose più veloci.
 - La **velocità di conduzione nervosa sensitiva (SNCV)** si calcola attraverso il rapporto tra la distanza presente tra la stimolazione e la registrazione (espressa in millimetri) e la latenza del SNAP; oppure se si utilizza una doppia registrazione, la SNCV si ottiene mediante il rapporto tra la distanza (in mm) tra i punti di registrazione, e la differenza della latenze registrate rispettivamente a livello prossimale e distale (espressa in m/sec).
- **Onde F**: permettono di valutare il funzionamento delle radici nervose ventrali e di indagare su quale sia la porzione di nervo maggiormente interessata dal processo morboso tra quella prossimale e quella . Tali onde derivano dalla conduzione antidromica nella fibra motoria dell'impulso nervoso generato dallo stimolo elettrico, a cui segue l'occasionale riflessione a livello del pirenoforo del motoneurone e dalla successiva conduzione ortodromica verso il muscolo. I nervi che vengono indagati con le onde F sono soprattutto il tibiale e l'ulnare. Sulla base della lunghezza dell'arto del soggetto testato è possibile calcolare la latenza minima attesa delle onde F. In presenza di alterazioni a carico del nervo testato è possibile riscontrare un aumento della latenza minima rispetto a quella attesa o una riduzione dell'ampiezza delle onde F. Il rapporto tra la conduzione distale e prossimale, prende il nome di **F-ratio**. Una F-Ratio al di sopra della norma indica un rallentamento prevalentemente prossimale (come accade ad

esempio delle radiculopatie), mentre una F-Ratio al di sotto della norma indica un rallentamento prevalentemente distale.

E' fondamentale ricordare che nella pratica clinica è altamente improbabile riscontrare delle alterazioni riconducibili a lesioni esclusivamente assonali o demielinizzanti. Una neuropatia con demielinizzazione estesa spesso si accompagna ad una lieve degenerazione assonale; così molte assonopatie si associano a processi demielinizzanti secondari. La **degenerazione assonale** viene evidenziata con elevata sensibilità, ma scarsa specificità, dall'esame elettromiografico (EMG) ad ago concentrico, anche se devono passare alcuni giorni perché la modificazione dell'attività elettrica muscolare possa instaurarsi (circa 4-6 giorni nei piccoli animali) (Cuddon, 2002). Lo studio della conduzione nervosa motoria permette di differenziare le forme demielinizzanti dai danni assonali. Nelle prime si osserva infatti un rallentamento della velocità di conduzione, senza riduzione dell'ampiezza del potenziale d'azione muscolare composito (CMAP), arrivando nelle forme più gravi, ad una dispersione temporale e polifasia del CMAP. Un altro quadro indicativo di lesione demielinizzante, che si verifica in presenza di gravi demielinizzazioni focali che interessano più di due internodi, è il blocco di conduzione, cioè la presenza di un CMAP evocato dalla stimolazione prossimale che ha un'ampiezza inferiore al 50% dell'ampiezza del CMAP prodotto dalla stimolazione distale dello stesso nervo .

Nei danni assonali si riscontra una riduzione generalizzata di ampiezza dei CMAP non associata a dispersione temporale. La velocità di conduzione in queste forme non si presenta ridotta, a meno che il danno assonale non sia tale da colpire buona parte delle fibre che conducono più velocemente.

Nella poliradiculoneurite acuta idiopatica i riscontri elettrodiagnostici di maggior riscontro sono (Cuddon, 2002):

- La presenza di attività muscolare spontanea, identificata all'esame elettromiografico (fibrillazioni e onde positive a fronte ripido)
- La diminuzione di ampiezza dei CMAP

- Un aumento della latenza minima delle onde F;; una diminuzione dell'ampiezza delle onde F fino, nei casi più gravi, alla loro scomparsa; un aumento dell' F-ratio

L'evidenza di reperti elettrodiagnostici, integrati dalle indagini istopatologiche, indicherebbero pertanto che nell' ACIP predominano le alterazioni relative ad un'assonopatia delle radici nervose ventrali e del nervo periferico nelle loro componenti motorie, sebbene sia stata documentata anche l'evidenza di reperti elettrodiagnostici di demielinizzazione (latenza aumentata delle onde F e un F-ratio aumentato) nelle radici ventrali e nelle parti più prossimali dei nervi periferici (Cuddon, 1998; Cuddon 2002).

L'esame del liquido cerebrospinale (liquor) è un test diagnostico di estrema utilità soprattutto nei soggetti affetti da patologie del sistema nervoso centrale di natura infiammatoria/infettiva. Il liquor può essere raccolto a livello dello spazio subaracnoideo della cisterna magna, oppure a livello lombare, tra la quinta e la settima vertebra lombare.

Nelle patologie infiammatorie, talvolta anche in quelle neoplastiche, il liquor è caratterizzato da:

- un aumento del numero dei leucociti, che in condizioni di normalità non supera le 5 cellule/microlitro (Platt et al. 2007)
- un incremento delle concentrazioni proteiche, che in corso di patologie flogistiche supera i 30 mg/dL per i prelievi dalla cisterna magna, o i 45 mg/dL per quelli effettuati a livello della regione lombare; la spiegazione di tale differenza potrebbe risiedere in una più lenta circolazione del liquido

cerebrospinale a livello lombare con conseguente accumulo locale di proteine (Di Terlizzi et al.,2009).

Le radici dei nervi spinali sono anch'esse bagnate dal liquor, pertanto è possibile riscontrare delle alterazioni nelle patologie in cui vi è un'inflammazione delle stesse; nel caso specifico della poliradicoloneurite acuta idiopatica, è possibile individuare un aumento del contenuto proteico del liquor, quando questo viene prelevato a livello della regione lombare (Cuddon, 2002, de Lahunta 2009). Tale incremento proteico, rappresenterebbe una dissociazione albuminocitologica, secondaria all'alterata permeabilità della membrana emato-encefalica nella porzione sub aracnoidea delle radici ventrali affette dal processo infiammatorio (Cuddon, 2002).

Seppure l'esame del liquor sia un esame contemplato nel protocollo diagnostico dell'ACIP, di norma non viene eseguito per l'aspecificità dei risultati, a fronte di un'invasività di tale esame e della necessità di effettuarlo in anestesia generale (Cuddon, 2002; de Lahunta 2009; Vite 2003).

La **biopsia muscolare e nervosa** si rivela utile in tutti quei casi in cui vi sia una sindrome miopatica o neuropatica, ma è di fondamentale importanza una scrupolosa metodica nell'esecuzione del prelievo. La scelta dell'area specifica da biopsiare, può essere indirizzata dal risultato dei test elettrodiagnostici, seppure di solito è preferibile evitare i muscoli eccessivamente atrofici, perché presumibilmente fibrotici o con infiltrati lipidici, le sedi in cui siano stati inseriti gli aghi elettromiografici e i punti di inserzione tendinea, perché differiscono anatomicamente dal ventre muscolare.

La biopsia muscolare deve essere effettuata mediante esposizione del ventre muscolare, evitando pertanto quella percutanea, ottenendo due campioni di circa 1, cm di lunghezza e 1 cm di altezza e larghezza ciascuno, con le fibre muscolari orientate longitudinalmente. Un campione viene refrigerato e inviato con opportuno metodo di refrigerazione entro 24-36 ore al laboratorio, onde evitare di perdere gli enzimi solubili e di assistere all'autolisi tissutale. Su questa aliquota vengono poi eseguite le

indagini istoenzimatiche per la tipizzazione miofibrile (ATPasi), la localizzazione di enzimi muscolari (esterasi, succinicodeidrogenasi) ed il riconoscimento di sostanze accumulate (glicogeno, lipidi).

L'altra aliquota viene invece fissata in formalina tamponata al 10% e sottoposta a colorazioni specifiche.

Le alterazioni istopatologiche osservate nel muscolo, permettono una classificazione patogenetica che si divide sostanzialmente in due gruppi:

- Miopatie primarie, nelle quali le miofibre sono la sede dell'alterazione patologica primitiva (infiammatorie e degenerative, congenite o acquisite)
- Miopatie di origine neurogena, dove il muscolo presenta alterazioni patologiche secondarie alla perdita di innervazione (legata a neuronopatie/assonopatie)

La biopsia del nervo deve essere anch' essa eseguita a carico dei nervi risultati alterati all'esame neurologico e/o elettrodiagnostico. Solitamente in corso di polineuropatie si sceglie il nervo peroneo comune nell'arto posteriore e il nervo ulnare nell'arto anteriore. La biopsia ottenuta deve essere posta in delicata tensione tramite aghi che ne fissino le estremità su di un supporto rigido rettilineo e conservata in formalina tamponata al 10%. In laboratorio il nervo viene studiato mediante sezioni longitudinali per valutarne l'integrità della guaina mielinica e della successione dei nodi di Ranvier, e sezioni trasversali per la valutazione della densità e morfologia delle fibre e delle guaine di rivestimento. Tra le alterazioni che coinvolgono il nervo periferico è possibile distinguere:

- La degenerazione assonale, spesso aspecifica e secondaria a traumi, tossici o disturbi metabolici, che interessano il soma e/o l'assone. Ad essa segue spesso una demielinizzazione secondaria e si può accompagnare a rigenerazione neuronale.
- La demielinizzazione segmentaria primitiva, che si verifica in seguito ad insulti primari della mielina o delle cellule di Schwann; essa consiste nella

perdita di uno o più segmenti di mielina lungo l'assone, senza essere accompagnata da lesioni assonali.

Come per le altre indagini diagnostiche, anche le modificazioni istologiche e istoenzimatiche, di norma non permettono di emettere una diagnosi eziologica definitiva, tranne in rari casi come nelle forme protozoarie.

Nell' ACIP le lesioni di più frequente riscontro, sono localizzate nelle radici nervose ventrali in quanto la patologia interessa primariamente le radici del nervo spinale.

Si rileva soprattutto un certo grado di degenerazione assonale, con demielinizzazione segmentale e paranodale e un infiltrato di cellule infiammatorie, che variano a seconda della durata dei segni clinici. I cani con sitomatologia acuta, mostrano una componente neutrofilia predominante, con un limitato numero di cellule mononucleate. Nei casi più cronici, è possibile osservare invece una componente linfocitaria, plasma cellulare e macrofagica. I tratti lombari e sacrali sembrano essere più colpiti rispetto a quelli cervicali e toracici, mentre, in accordo con la natura della patologia, le porzioni nervose più distali, presentano delle alterazioni meno significative (Cuddon, 2002).

E' riportato anche un coinvolgimento delle radici nervose dorsali, sebbene il loro coinvolgimento risulti decisamente meno marcato rispetto a quello delle radici nervose ventrali.

Per tale ragioni è essenziale la valutazione integrata dei dati clinico-anamnestici, elettrofisiologici ed istomorfologici per inquadrare correttamente una malattia neuromuscolare.

CAPITOLO 3

LA POLIRADICOLONEURITE ACUTA IDIOPATICA CANINA

3.1 INTRODUZIONE ED EZIOPATOGENESI

La poliradicoloneurite acuta idiopatica è un'entità patologica ad insorgenza acuta o iperacuta, caratterizzata classicamente da una tetraparesi o tetraplegia flaccida che può interessare dapprima i soli arti posteriori, ma che poi tende a coinvolgere anche quelli anteriori. La malattia è stata inizialmente descritta nei cani impiegati per la caccia al procione, come esito del morso della preda, da cui il nome di *paralisi da morso del procione o paralisi del coonhound* (dall'inglese coonhound = cane da caccia al procione) (Cummings, 1982) (Bernardini, 2010).

Secondo alcuni studi, si è potuto riprodurre la malattia attraverso l'inoculazione della saliva del procione solo in cani che avevano presentato precedentemente la malattia in forma spontanea (Holmes, 1979; De Lahunta, 2009) e ne erano guariti; pertanto, l'evidenza che non tutti i soggetti morsicati si ammalavano, ha indotto ad ipotizzare che occorra una predisposizione individuale per lo sviluppo della sintomatologia, in risposta ad un fattore scatenante contenuto nella saliva dei procioni.

La presenza di una patologia pressochè identica alla Coonhound paralysis è però stata riscontrata anche in cani mai entrati in contatto col procione, oppure abitanti in aree geografiche dove tale specie non è presente. I reperti clinici, laboratoristici e biotipici hanno permesso di evidenziare una totale sovrapposizione di questa malattia con la paralisi del coonhound, portando perciò a preferire l'utilizzo del termine *poliradicoloneurite acuta idiopatica* per definire entrambe le forme (High, 1996). La sua distribuzione è pertanto estesa a livello mondiale e sembrerebbe avere un'incidenza maggiore di quella comunemente suggerita dalla letteratura (Vite, 2003). La malattia colpisce i cani giovani-adulti o adulti anche se, in un case report abbastanza datato, è stato riportato un sospetto caso in un cucciolo di 14 settimane (Charteris, 1988).

Sebbene la patogenesi dell'ACIP non sia del tutto chiarita, è stato proposto un meccanismo immuno-mediato analogamente a quanto avviene in medicina umana nella GBS (Arnason e Soliven, 1993). E' stato ipotizzato un meccanismo umorale e cellulo-mediato contro un agente infettivo presente nel sistema nervoso, con un danno assonale e mielinico secondario, oppure, più probabilmente, un coinvolgimento primario del SNP, mediante la presenza di autoanticorpi e di un'immunità cellulo mediata, diretta verso alcune componenti lipidiche o proteiche dei nervi periferici (Cuddon, 2002). Perché si verifichi quest'ultima ipotesi si rendono necessarie due condizioni:

- a) l'esposizione degli epitopi (target per gli anticorpi) sulla superficie esterna del rivestimento mielinico;
- b) l'accesso degli esterni da parte degli anticorpi in seguito ad una rottura della barriera emato-nervosa.

Le porzioni oligosaccaridiche dei glicolipidi, glicoproteine e proteoglicani, sono esposte proprio sulla superficie esterna del rivestimento mielinico, rappresentando pertanto un ottimo target per l'attacco da parte del sistema immunitario. Molti anticorpi sembrerebbero reagire nei confronti degli antigeni glicolipidici, che sono rappresentati soprattutto dai gangliosidi, i cui maggiori target sono rappresentati dal GM1, GD1a, GD1b, GT1a, and GT1b (Cuddon, 2002). Secondo uno studio (xxx), si documentata la possibilità attraverso la quale, una componente lipopolisaccaridica di alcuni batteri (come il *Campylobacter jejuni*) contenga un epitope simile ai gangliosidici del nervo periferico, che potrebbe scatenare il sistema immunitario, con una risposta auto-anticorpale in grado di attaccare i componenti del nervo periferico, inducendo un meccanismo cosiddetto di "*molecular mimicry*".

Si presume che per la manifestazione di tale malattia debbano verificarsi due condizioni fondamentali: da una parte l'esposizione ad un antigene specifico che può

derivare da un'ampia varietà di fonti, quindi non necessariamente rappresentato dalla saliva del procione; dall'altra la presenza di un'alterazione del sistema immunitario del paziente (De Lahunta, 2009). In uno lavoro di recente pubblicazione (Holt et al., 2011) è stata presa in considerazione una popolazione di 44 cani affetti da poliradicoloneurite acuta idiopatica, di età compresa tra 1 e 11 anni e senza alcuna predisposizione di sesso o razza, in cui è stato riscontrato un titolo anticorpale statisticamente significativo nei confronti di *Toxoplasma gondii*.

3.2 PRESENTAZIONE CLINICA

Come accennato in precedenza, di solito la poliradicoloneurite acuta idiopatica insorge nell'arco di poche ore o giorni, seppure non di rado si può presentare anche in modo iperacuto (Cuddon 2002).

Spesso, ma non sempre, si assiste ad una paralisi che coinvolge inizialmente gli arti posteriori, e poi tende a progredire coinvolgendo anche gli arti anteriori, anche se nell'esperienza di alcuni autori (Cuddon, 2002) è possibile anche il contrario, vale a dire un'iniziale interessamento degli arti anteriori con estensione secondaria a quelli posteriori.

I deficit deambulatori sono quasi esclusivamente di tipo motorio, senza evidenti alterazioni sensoriali, per via di una predominanza delle lesioni a carico delle radici ventrali, da cui il nome poli-*radicolo-*neurite.

Nelle forme meno gravi, caratterizzate da paresi, oppure nelle fasi iniziali, il sintomo principale è quello di una debolezza generalizzata, che tende ad accentuarsi con il progredire della deambulazione (intolleranza all'esercizio).

Di norma, si evidenzia la presenza di una tetraparesi non deambulante fino alla tetraplegia flaccida, che induce spesso il paziente al decubito laterale. L'ipotonia generalizzata accompagna tale sintomatologia, e in molti casi si denota un'incapacità nel sollevare la testa, quale espressione di debolezza della muscolatura cervicale.

I riflessi spinali si presentano uniformemente diminuiti o addirittura assenti in virtù della mancata integrità della componente motoria dell'arco riflesso spinale, mentre i nervi cranici sono comunemente risparmiati, seppure sia possibile osservare la perdita o il calo della voce (rispettivamente afonia o disfonia), oppure un coinvolgimento del nervo facciale, che in rari casi può presentare una lieve paresi (De Lahunta, 2009, Cuddon 2002).

A differenza di altre patologie neuromuscolari, non sono di norma presenti alterazioni a carico dell'esofago, come il megaesofago (Cummings et al., 1982; Cuddon, 2002).

In alcuni cani è possibile osservare all'esordio della sintomatologia, la presenza di iperestesia generalizzata, che sembra riflettere un coinvolgimento anche delle strutture sensoriali, la cui patogenesi non risulta ancora del tutto chiarita.

Precocemente si ha l'insorgenza di un'atrofia muscolare generalizzata (7-10 giorni), che nell'arco di poco tempo evolve in maniera piuttosto grave .

Nella maggior parte dei soggetti, la sintomatologia di norma evolve verso un lento e progressivo miglioramento, che porta alla guarigione entro 4-6 mesi dall'insorgenza dei segni clinici. In alcuni casi non si osservano miglioramenti, o questi sono solo modesti. Una discreta percentuale di cani (12%) può morire per complicazioni di tipo respiratorio (paralisi diaframmatica e dei muscoli respiratori intercostali) Sono segnalate con minore frequenza, delle presentazioni cliniche meno classiche, con dei deficit motori lievi (tetraparesi deambulante) o con un coinvolgimento neuromuscolare non diffuso (con coinvolgimento ad esempio dei soli arti posteriori) (Cuddon, 2002).

In letteratura vi sono pochi studi in cui vengono prese in considerazione le caratteristiche cliniche della ACIP , ed il numero di cani preso in considerazione è spesso esiguo. Nel totale sono stati ad oggi documentati su riviste scientifiche peer reviewed solo 32 casi di poliradicoloneurite acuta canina (includendo anche quelli denominati *paralisi del coonhound*), e di tali soggetti il 47% (n=15) è sopravvissuto, mentre il 53% (n=17) è deceduto (Northington, 1982; Cummings, 1966; Cummings 1982; Vandeveld 1981). Tra questi ultimi, nel 23,5% (n=4) la morte è stata attribuita

a delle complicazioni respiratorie, mentre gli altri sono stati sottoposti ad eutanasia per il volere del proprietario. Occorre considerare che questi studi sono tutti molto datati e pertanto, sulla base di una conoscenza più limitata sulla malattia, la decisione di effettuare l'eutanasia potrebbe essere stata intrapresa anche su quei pazienti che avevano possibilità di ripresa nel lungo termine.

In un lavoro in cui sono stati esaminati gli aspetti elettrodiagnostici di 12 cani affetti da poliradicoloneurite acuta (Cuddon, 1998), analizzando nel dettaglio la casistica esaminata, è emersa una sintomatologia riferibile a dei deficit motori nel 100% dei casi, con una variabilità che andava da una lieve tetraparesi deambulante in 1 soggetto (8%), una non deambulante in 5 casi (42%), fino alla tetraplegia in 5 cani (42%), mentre nel restante caso (8%) si è osservata una paraplegia con paresi degli arti anteriori.

I riflessi spinali sono risultati diminuiti nel 42% dei casi (n=5), assenti nell'altro 42% (n=5), mentre nel caso in cui vi era paraplegia i riflessi risultavano assenti negli arti posteriori e diminuiti negli anteriori. In un altro caso (8%) vi era la concomitanza di riflessi diminuiti e assenti, senza un'indicazione più specifica. Seppure non fosse evidenziato dall'autore, in quanto non era lo scopo del lavoro, ad un'attenta analisi dei dati, non è stata riscontrata alcuna correlazione tra la diminuzione e l'assenza dei riflessi spinali, e la gravità dei segni neurologici.

In un altro lavoro (Hirschvogel, 2012) in cui si è valutata l'efficacia delle immunoglobuline umane come trattamento terapeutico farmacologico, è stato riscontrato un deficit deambulatorio in tutti e 30 i cani esaminati, con una sintomatologia neurologica che ha coinvolto i 4 arti nel 100% dei casi ed è risultata così ripartita:

- Tetraparesi non deambulante 63 % (n=19)
- Tetraplegia 37 % (n=11)

Nella stessa popolazione è stato rilevato inoltre una concomitanza di:

- iperestesia nel 27% dei soggetti (n=8)
- un coinvolgimento dei muscoli respiratori nel 17% dei casi (n=5)
- un'alterazione dei nervi cranici nel 47% (n=23), rappresentata dalla presenza di disfonia (coinvolgimento del Nervo Vago) nel 73% (n=22) e di paralisi del nervo facciale nel 10% dei casi (n=3).

Uno di questi cani è deceduto per paralisi respiratoria, mentre un altro è stato sottoposto ad eutanasia per volere del proprietario.

Di norma si può affermare che, in tale malattia, la sintomatologia rimane stazionaria per circa 2-3 settimane, migliorando lentamente fino ad un recupero completo delle funzioni deambulatorie.

Sono descritte infine delle forme croniche, in cui si assiste al periodico recidivare dei sintomi clinici, in particolare della loro severità (De Lahunta 2009; Cuddon, 2002).

3.3 COMPARAZIONE CON LA SINDROME DI GUILLAIN-BARRE' UMANA

In medicina umana, la causa più comune responsabile di tetraplegia flaccida è una poliradiculoneuropatia infiammatoria acuta, con marcata infiltrazione del sistema nervoso periferico e penetrazione macrofagica primaria della lamina basale delle cellule di Schwann, con alterazione della guaina mielinica (Hughes et al., 1999; Yu et al., 2006), conosciuta come *sindrome di Guillain-Barré* (o poliradicoloneurite acuta idiopatica) che, secondo numerosi studi, mostra notevoli similitudini con la poliradicoloneurite acuta idiopatica canina (Cummings and Haas, 1967 e 1972; Northington and Brown, 1982; Cuddon, 2002; Olby, 2004; de Lahunta, 2009).

La prima descrizione della malattia avvenne nel 1859 a opera del medico francese Jean Landry e nel 1916, Georges Guillain, Jean Alexandre Barré e André Strohl la

diagnosticarono su due pazienti in concomitanza di un anomalo riscontro di un aumento della produzione di proteine nel liquido cefalorachidiano.

Esistono evidenze scientifiche sull'esistenza di un meccanismo di *molecular mimicry* alla base della sindrome di Guillain Barrè. Tale meccanismo si spiegherebbe con la presenza di un'esposizione del sistema immunitario del paziente ad un antigene esogeno, come avviene nel caso di infezioni da parte del batterio *Campylobacter jejuni*, in cui il lipopolisaccaride capsulare conterrebbe antigeni simili a quelli dei gangliosidi contenuti nella mielina del SNP. Gli anticorpi che vengono prodotti dal sistema immunitario, rivolti primariamente verso l'antigene capsulare del batterio, tendono ad attaccare anche i gangliosidi mielinici, producendo spesso un danno mielinico predominante, con conseguenti ripercussioni assonali. In altri casi, si può osservare invece la presenza di altri antigeni esogeni, che producono una reazione rivolta direttamente contro l'assone (danno primario assonale con possibile demielinizzazione secondaria) (Ang, 2000; Bersudsky, 2000; Neisser, 2000). Il *Campylobacter* sembrerebbe essere il più comune fattore scatenante, seguito dal citomegalovirus in ordine di frequenza e da numerosi altri trigger che sono stati identificati in diversi case reports o di cui è stata fortemente sospettata una correlazione eziopatogenetica (Hughes, 1999). Tra questi ricordiamo precedenti infezioni virali (tra cui il Virus dell'immunodeficienza umana, o dall'inglese human immunodeficiency virus: HIV; l'encefalite da zecche, o Tick Borne disease: TBE; Epstein-Barr virus: EBV), spirochete, *Mycoplasma pneumoniae* o l'esecuzione di trattamenti vaccinali (Jacobs et al., 1998; Hughes, 1999). In alcuni casi si è avanzato il sospetto di una correlazione con agenti trasmessi da zecche, come *Rickettsia conorii* (de Galan, 1999).

Nei pazienti affetti dalla Sindrome di Guillain-Barré (GBS, dall'inglese Guillain Barré Syndrome) è possibile evidenziare la presenza di anticorpi anti-gangliosidi (Yuki and Hartung, 2012), considerati importanti mediatori per lo sviluppo della patologia

(Willison and Yuki , 2002; Willison, 2005). Questi anticorpi sembrerebbero intervenire attraverso l'attivazione della cascata del complemento, che porta alla formazione di un complesso attaccato alla membrana in grado di alterare il flusso ionico e di acqua lungo il gradiente di diffusione, che porta alle alterazioni patologiche di tali strutture (O'Hanlon et al., 2001; McGonigal et al., 2010; Rupp et al., 2012).

Con il contributo dei pazienti che afferiscono a questo progetto, è stata documentata pochi mesi fa la presenza di anticorpi anti-gangliosidi anche nella specie canina (Rupp, 2013).

Nel cane lo stimolo antigenico non è stato ancora individuato, seppure un recente studio abbia identificato una positività significativa al *Toxoplasma gondii* nel siero di cani affetti da poliradiculoneurite idiopatica (Holt, 2011).

Nell'uomo predomina la forma demielinizzante, conosciuta come **poliradiculoneuropatia demielinizzante infiammatoria acuta**, ma si riconosce anche una forma assonale, che può coinvolgere la sola porzione motoria (**AMAN** dall'inglese: *Acute Motor Axonal Neuropathy*) oppure sia la motoria che la sensoriale (**AMSAN** dall'inglese: *Acute Motor and sensory Axonal Neuropathy*) (Feasby et al., 1986).

Clinicamente la GBS si presenta con una paralisi flaccida che interessa la porzione prossimale e distale degli arti, che di norma si diffonde coinvolgendo anche i nervi cranici, seppure siano segnalate anche forme focali. Si accompagna ad ariflessia generalizzata e talvolta a iperalgesia. Circa il 30% dei pazienti necessita di un intervento ospedaliero per il coinvolgimento dei muscoli respiratori.

La **sindrome di Fisher**, che si manifesta attraverso oftalmoplegia, atassia e perdita dei riflessi mio tattici, in assenza di deficit motori, è stata correlata alla GBS e quindi classificata come sua variante (Fisher, 1956). Altre due varianti decisamente più rare della GBS sono: la **Neuropatia acuta autonoma** (Low et al., 1983) e l' **Encefalite del tronco cerebrale di Bickerstaff** (Koga et al., 2012). La prima coinvolge il sistema nervoso simpatico e parasimpatico e si accompagna principalmente ad ipotensione

posturale, diminuzione della salivazione, della lacrimazione e anomalie pupillari e a sintomi cardiovascolari, mentre la seconda è caratterizzata da una rapida insorgenza di areflessia e deficit sensoriali.

Secondo alcuni autori (Cuddon, 2002) la fase della progressione dei segni clinici, dura circa 5-10 giorni nella poliradicoloneurite idiopatica acuta canina, mentre nell'uomo, la fase progressiva della GBS può durare fino a 4 settimane (Winer, 2001).

In quest'ultima il recupero completo avviene in circa l'80% dei pazienti in un tempo che va da pochi mesi a un anno (Telleria-Diaz e Calzada-Sierra, 2002), mentre sequele neurologiche permanenti minori, come ad esempio l'areflessia, possono verificarsi nel 10%-40% dei casi (Dornonville de la Cour C, Jakobsen J, 2005)

Nel cane si osserva invece il decesso in una discreta percentuale di casi (12%) per complicazioni di tipo respiratorio (paralisi diaframmatica e dei muscoli respiratori intercostali) (Cuddon, 2002), mentre nella GBS la morte può avvenire in una limitata percentuale di pazienti, che si aggira intorno all' 8% nella fase acuta della malattia (Winer, 2001), ma che può arrivare fino al 15% entro un anno dall'insorgenza della sintomatologia (Vucic et al., 2009).

3.4 DIAGNOSI

La diagnosi di poliradicoloneurite acuta idiopatica si basa essenzialmente sulle caratteristiche cliniche, caratterizzate dalla rapida insorgenza di una paresi da motoneurone inferiore diffusa, che porta rapidamente verso la tetraplegia. Per questa malattia non esistono delle procedure elettive che permettano di ottenere una diagnosi definitiva, che, di base, viene ottenuta attraverso l'integrazione delle caratteristiche anamnestiche, neurologiche, del decorso e i risultati dei test elettrodiagnostici, delle biopsie neuromuscolare e dell'esame del liquido cerebrospinale. Tutte queste indagini non producono risultati patognomonici se analizzati singolarmente, ma nel contesto

della sintomatologia permettono di supportare il sospetto clinico, permettendo di scartare le altre possibili diagnosi differenziali.

Gli studi elettrodiagnostici evidenziano alterazioni del muscolo e del nervo. L'elettromiografia può dimostrare la presenza di potenziali di fibrillazione e onde acute positive, che testimoniano la presenza di una miopatia neurogena. L'EMG non sembrerebbe utile per una diagnosi precoce, in quanto le alterazioni si evidenziano in sesta-settima giornata.

I test di valutazione della funzionalità del nervo periferico possono mostrare::

Tuttavia, in uno studio elettrodiagnostico eseguito su 12 cani affetti da sospetta poliradicoloneurite acuta idiopatica, si è in realtà dimostrata la presenza di alterazioni elettrodiagnostiche nel 100% dei casi, in particolare elettromiografiche, anche nei 4 casi in cui i sintomi clinici erano presenti da un periodo di tempo inferiore o uguale ai 4 giorni (nello specifico andava dalle 36 ore ai 4 giorni).

I rilievi patologici a carico della radice nervosa sono quelli di una poliradicoloneurite, con demielinizzazione segmentale e concomitante degenerazione mielinica e assonale. Possono essere associate infiltrazioni leucocitarie, della serie monocitica-macrofagica e qualche assembramento linfocitario e plasmacellulare. Le biopsie del nervo periferico evidenziano di solito dei reperti aspecifici in quanto sono effettuate distalmente al processo patologico che interessa le radici ventrali del nervo spinale. La biopsia della radice nervosa si presenta estremamente complessa e pertanto di norma non viene eseguita nella comune pratica clinica.

La porzione prossimale delle radici dei nervi è a contatto con lo spazio subaracnoideo e quindi con liquido cerebrospinale (liquor). E' pertanto possibile evidenziare all'esame del liquido cerebrospinale, un aumento aspecifico della concentrazione delle proteine, spesso non associato a variazioni della componente cellulare (Cuddon, 2002).

3.5 PROGNOSE E TERAPIA

Nella maggior parte dei casi la prognosi è favorevole, quando la terapia è instaurata rapidamente, nonostante il decorso clinico abbia una lunga durata e sia direttamente proporzionale alla severità delle lesioni. La maggior parte dei cani mostrerebbe una guarigione completa entro 6 mesi (Northington and Brown, 1982; Cuddon, 2002; de Lahunta and Glass, 2009). Tuttavia in una piccola percentuale di casi la prognosi è infausta o il recupero non è completo. Nella poliradicoloneurite idiopatica acuta, è possibile osservare il decesso in quei pazienti che manifestano una paralisi dei muscoli respiratori o una polmonite ab ingestis, fenomeni che si verificano circa nel 12% dei pazienti (Hirschvogel et al., 2012). Il grado e la percentuale di recupero sembra essere correlata con il bersaglio specifico del sistema immunitario. Infatti lesioni prevalentemente mieliniche hanno un decorso e una prognosi migliori rispetto alle lesioni assonali, in relazione alla pronta capacità delle cellule di Schwann di produrre rapidamente nuova mielina. La rapidità e la possibilità di un completo recupero, che può in alcuni casi perdurare mesi, sembrano essere pertanto correlate al grado delle lesioni che coinvolgono gli assoni. Anche se occasionalmente si può assistere ad un mancato recupero, tendenzialmente vi sono delle alte percentuali di completa guarigione del paziente. Questo dato, unitamente ad un'apparente mancanza di influenza da parte della terapia immunosoppressiva, sosterebbe l'ipotesi che l'alterazione del sistema immunitario, sia di breve durata. Inoltre non sembra esservi alcuna protezione immunitaria contro il rischio di eventuali recidive. (de Lahunta, 2009).

La terapia è essenzialmente mirata alle cure intensive di tipo infermieristico, volte alla prevenzione di piaghe di decubito, dermatiti e così via, attraverso il mantenimento del cane sopra un substrato morbido, avendo cura di cambiare spesso il decubito. Le funzioni di minzione e defecazione vengono spesso mantenute autonomamente, anche se può rendersi utile esercitare una lieve pressione addominale, per favorire l'urinazione. Nonostante non vi sia spesso un coinvolgimento dei nervi cranici preposti

alle funzioni di deglutizione e masticazione, talvolta può esserci una tale debolezza della muscolatura cervicale, che si rende necessario un aiuto nel favorire l'alimentazione e l'abbeverata del paziente.

Il punto cruciale del trattamento della ACIP, risulta essere l'esecuzione di un programma fisioterapico intensivo, impostato su base giornaliera (De Lahunta, 2009; Cuddon, 2002).

Nell'uomo la terapia prevede plasmaferesi ed infusione endovenosa di immunoglobuline, mentre la terapia corticosteroidica risulta solitamente inefficace. (van Doorn et al., 2008; Vucic et al., 2009). Nonostante le misure terapeutiche adottate, come accennato in precedenza, circa il 4%–15% dei pazienti muore entro un anno dall'insorgenza della sintomatologia (Vucic et al., 2009) e, tra questi, l'8% nello stadio acuto della malattia (Winer, 2001).

Analogamente anche in medicina veterinaria, recenti studi hanno dimostrato che, a fronte di una mancata significatività statistica, è stata comunque osservata una reale efficacia nel miglioramento della prognosi in cani trattati con infusione di immunoglobuline per via endovenosa, che hanno presentato un minore intervallo di tempo necessario per il recupero clinico, rispetto al gruppo di controllo che non aveva ricevuto tale terapia (Hirschvogel, 2012). L'utilizzo della terapia corticosteroidica non sembrerebbe apportare nessun beneficio anche nella specie canina (Cuddon, 2002).

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO 4

OBIETTIVI DEL LAVORO e CRITERI DI INCLUSIONE

4.1 Premessa

In letteratura sono presenti relativamente pochi studi in grado di fornire un contributo significativo sul tema della poliradicoloneurite acuta idiopatica del cane (Rupp 2013, Hirschvogel 2012, Rutter 2011, Molin 2011, Holt 2011, Boydell 2010, Gehring 2001, Cuddon 1998, High 1996, Northington 1982, Cummings 1982, Northington 1981, Vandeveld 1981, Duncan 1980, Harve 1979, Rivard 1977, de Morsier 1973, Cummings 1966); cinque di questi hanno descritto un singolo caso (Molin 2011, Gehring 2001, High 1996, Harve 1979, Rivard 1977). I lavori dell'ultimo decennio si sono focalizzati prevalentemente sulla ricerca di biomarkers (Rupp, 2013), sulla prognosi in seguito all'adozione di particolari misure di terapia intensiva (Rutter, 2011) e sulla risposta terapeutica all'utilizzo di terapie comparabili a quelle utilizzate nella similare sindrome umana (Hirschvogel, 2011).

Sulla base dell'esperienza acquisita nella Sindrome di Guillain Barré, un recente studio effettuato negli Stati Uniti ha cercato di evidenziare, su una popolazione di 44 cani, una correlazione tra l'esposizione del sistema immunitario a determinati batteri, virus e protozoi, e l'insorgenza della poliradicoloneurite (Holt, 2011).

I lavori che descrivono in maniera dettagliata le caratteristiche cliniche e l'outcome della poliradicoloneurite risalgono tutte a date antecedenti il 2003, e in essi vengono descritti solo pochi casi, (Northington 1981, Cummings 1982) ad eccezione del lavoro di Northington del 1982, in cui i soggetti documentati sono 14. Tra gli studi che hanno fornito il maggiore contributo alle conoscenze sulla malattia è da ricordare una review pubblicata nel 2002 (Cuddon, 2002), mentre gli altri lavori risalgono tutti ai primi anni 80 e 70.

4.2 Obiettivi

Il presente progetto di ricerca si pone l'obiettivo di descrivere i principali aspetti clinici e diagnostici della poliradiculoneurite acuta idiopatica attraverso la valutazione delle cartelle cliniche di 26 cani risultati affetti dalla malattia.

L'indagine ha attinto ad una casistica ottenuta sia da una valutazione retrospettiva che da un progetto di lavoro prospettico specificamente disegnato.

La necessità di ovviare alla difficoltà nell'ottenere un appropriato numero di casi di poliradiculoneurite acuta idiopatica canina adeguatamente documentati ha richiesto la collaborazione di altre strutture per l'ampliamento della casistica, portando al compimento di uno studio multicentrico, che ha coinvolto non solo l'Università di Bologna, ma anche l'Università di Parma e l'Università di Sassari.

Nello specifico, in aggiunta ai casi afferiti presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'università di Bologna, sono stati presi in considerazione quelli pervenuti presso l'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Parma, con referenti il Dott. Ezio Bianchi e il Prof. Maurizio Dondi, e quelli presso il Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Clinica Chirurgica dell'Università di Sassari, con referente la Dott.ssa Maria Lucia Manunta.

In particolare, sulla popolazione oggetto di studio, il progetto si è proposto di:

1. Descrivere le caratteristiche cliniche e il decorso della malattia adeguatamente documentati dalle indagini cliniche e dal profilo ematobiochimico.
2. Verificare l'utilità dei test diagnostici, in particolare elettrodiagnostici, comparandoli con quanto riportato in letteratura.
3. Valutare l'eventuale correlazione tra l'esposizione del sistema immunitario a specifici batteri, virus e protozoi (precisamente *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*) e l'insorgenza della poliradiculoneurite.

4. Valutare la significatività dell'esposizione ad altri potenziali fattori scatenanti (trigger) rappresentati da vaccinazioni, eventi fisiologici come gravidanza, allattamento o infezioni paucisintomatiche di altri organi o apparati di pertinenza non neurologica, avvenuti in un breve lasso di tempo precedente l'insorgenza della poliradicoloneurite.
5. Verificare la presenza di anticorpi anti-gangliosidi GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GD3, GA1, GalC e Sulph e dei loro complessi eteromerici, per valutarne la reale utilità come biomarkers diagnostici di tale patologia, e distinguerne i sottotipi per interpretarne una possibile correlazione verso taluni agenti infettivi come avviene nell'uomo.

4.3 Selezione della popolazione: criteri di inclusione

Per la definizione della popolazione oggetto di studio, il criterio di inclusione è stato la presenza di una diagnosi clinica di poliradicoloneurite idiopatica canina, elaborata sulla base dei seguenti parametri:

- Esecuzione di un visita clinica completa, preceduta dalla raccolta dell'anamnesi e comprendente l'esame obiettivo generale e l'esame obiettivo particolare degli apparati cardiocircolatorio, respiratorio e nervoso (esame neurologico). La visita clinica è stata completata dall'annotazione di eventuali terapie utilizzate e dei dati concernenti il decorso, il quale doveva durare non meno di un mese.
- Riscontro di un esame emocromocitometrico e di un profilo biochimico generale nei limiti della norma o con alterazioni non significative di altra patologia in atto;

- Presenza, nei casi possibili, di reperti elettrodiagnostici che supportassero la diagnosi della malattia;
- Disponibilità di siero per ulteriori indagini, conservato in maniera idonea, ovvero stoccato subito dopo il prelievo ad una temperatura di -20 o -80 °C.

CAPITOLO 5

MATERIALI E METODI

5.1 CASI CLINICI

Nel presente lavoro sono state retrospettivamente analizzate le cartelle di 42 cani affetti da poliradicoloneurite idiopatica acuta afferiti, in un periodo compreso tra Novembre del 2008 e Giugno del 2012, presso:

- il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma mater Studiorum - Università di Bologna,
- l'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Parma,
- il Dipartimento di Patologia e Clinica Veterinaria, Sezione di Clinica Chirurgica dell'Università di Sassari.

Tra questi, 16 casi sono stati esclusi dallo studio per i seguenti motivi: in 15 vi era la mancanza di materiale biologico stoccato in adeguate condizioni e in 1 soggetto non si avevano sufficienti dati relativi all'anamnesi e pertanto non si poteva stabilire con certezza l'insorgenza acuta della sintomatologia. I soggetti ritenuti idonei per partecipare al presente progetto di ricerca, sono risultati pertanto essere 26.

In tutti i casi si è proceduto all'esecuzione di:

- Un *esame obiettivo generale*, seguito dall'esame particolare degli apparati:
 - Cardiocircolatorio
 - Respiratorio
- Un *esame obiettivo particolare dell'apparato nervoso (esame neurologico)* in cui, considerando le caratteristiche della poliradicoloneurite acuta idiopatica, è stata posta particolare attenzione alla valutazione:
 - dell'esame dell'andatura,

- dell'esame dei riflessi spinali,
 - dell'esame del tono e trofismo muscolare,
 - dell'esame dei nervi cranici
- Un *esame emocromocitometrico completo* e un *profilo ematobiochimico*, comprendente i livelli sierici dei seguenti parametri: azoto ureico (BUN), creatinina, glucosio, proteine totali, albumina, globuline, fosfatasi alcalina (ALP), alanina aminotransferasi (ALT-GPT), aspartato aminotransferasi (AST-GOT), creatinfosfochinasi (CPK), bilirubina totale, potassio, sodio, cloro, calcio. In una parte della popolazione oggetto di studio sono stati inoltre esaminati: la gamma-glutamilttransferasi (GGT), il colesterolo, la lipasi, l'amilasi, la lattico deidrogenasi (LDH), gli acidi biliari pre prandiali, il protidogramma.

Nei soggetti in cui si è ritenuto necessario (n=9), è stata valutata la *funzionalità tiroidea* mediante la determinazione del TSH, fT4 e T4, mentre nei casi in cui vi era la diagnosi differenziale di miastenia gravis (n=5), si è eseguita la determinazione della concentrazione degli anticorpi contro i recettori per l'acetilcolina.

5.2 INDAGINI COLLATERALI AGGIUNTIVE

In 20 soggetti sono state eseguite le *indagini elettrodiagnostiche* (utilizzando lo strumento Myoquick, Micromed S.p.A., Treviso, Italia) consistite per ciascun soggetto in uno studio elettromiografico dei muscoli appendicolari, epiassiali e della testa, e nella determinazione della velocità di conduzione sia motoria che sensitiva, valutata a livello di nervo tibiale e/o nervo ulnare.

Durante gli esami elettrodiagnostici sono stati valutati:
per l'elettromiografia:

- la presenza di attività muscolare inserzionale spontanea (fibrillazioni e onde positive a fronte ripido).

per i test di conduzione nervosa:

- l'ampiezza, la durata e l'area del potenziale d'azione muscolare composto (CMAP), secondo quanto illustrato nel secondo capitolo;
- la presenza di dispersione temporale del CMAP,
- la presenza di blocchi di conduzione.
- la velocità di conduzione motoria (MNCV) e sensitiva (SNCV), considerate in relazione ai normali valori di riferimento pubblicati precedentemente in letteratura (Cuddon, 2002), a cui per brevità si rimanda.
- La presenza delle onde F
- La risposta alla stimolazione nervosa ripetuta,
- La presenza e l'aspetto dei potenziali "cord dorsum"

Gli esami elettrodiagnostici sono stati eseguiti con il paziente in anestesia generale e la temperatura corporea è stata mantenuta al di sopra dei 36°C, mediante l'uso di tappetini riscaldanti.

In 4 soggetti è stato possibile eseguire una biopsia del muscolo tibiale craniale. Il campione muscolare è stato suddiviso in due aliquote, di cui una conservata in formalina tamponata al 10% e valutata dopo colorazione specifica (ematossilina-eosina, tricromica di Gomori, PAS), mentre l'altra, disponibile in 3 campioni su 4, è stata invece refrigerata e utilizzata per le determinazioni enzimatiche (ATPasi pH 4,3 e 9,8, Oil Red O, esterasi, COX, NADH-TR, SDH). Le indagini istopatologiche ed immunoenzimatiche sono state eseguite presso il Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti, Dipartimento di Scienze Veterinarie, dell'Università di Pisa.

L'esame del liquido cerebrospinale (n=2) è stato effettuato anch'esso in anestesia generale, ponendo il soggetto in decubito laterale. Il prelievo è avvenuto dalla zona

lombare, precisamente nello spazio sub aracnoideo tra la quinta e la sesta vertebra lombare, ed è stato subito sottoposto ad esame quantitativo mediante una camera conta globuli (Fuchs-Rosenthal) e lettura al microscopio ottico (Nikon Eclipse E200), mentre per la valutazione qualitativa è stata utilizzata una citocentrifuga (Shandon) con colorazione rapida di tipo Romanowsky (Diff-Quick-Stain) e successiva lettura microscopica dei vetrini.

5.3 INDAGINI SIEROLOGICHE

In considerazione dell'obiettivo della tesi, sul siero di tutti i soggetti sono state effettuate indagini sierologiche volte alla ricerca degli anticorpi contro *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum* (n=26). La metodica utilizzata è stata per ciascuna determinazione quella dell'immunofluorescenza indiretta, volta all'identificazione delle IgG contro gli agenti infettivi sopraelencati. È stato ritenuto positivo un titolo anticorpale superiore a 1:40.

5.4 MARKER DIAGNOSTICI

Un'aliquota di tutti i sieri è stata inviata presso il *Neuroimmunology Group, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical, Veterinary and Life Sciences*, dell'Università di Glasgow, UK per partecipare ad uno studio sperimentale di ricerca anticorpale Anti-Gangliosidi dei seguenti anticorpi: GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GD3, GA1, GalC e Sulph e dei loro complessi eteromerici (ad es. GM1/GM2, GM1/GD1a, GM1/GD1b e così via), per un totale di 55 target.

Tale indagine è stata eseguita attraverso una metodica che ha utilizzato una matrice glicoproteica (*Glicoarray*), utilizzando la procedura descritta recentemente in uno

studio (Rinaldi et al, 2009), che ha evidenziato una maggiore sensibilità rispetto alla tradizionale tecnica ELISA (Rupp et al, 2013). In breve, la glicomicroarray utilizzata ha previsto l'apposizione di uno spot di glicolipidi (precisamente 0.1 μ l dei glicolipidi GM1, GM2, GD1a, GD1b, GT1a, GT1b, GD3, GA1, sulfatide-sulph e del galattocerebroside-GalC) e di un complesso eteromero di tutti questi glicolipidi in metanolo (100 μ g/ml), sulle membrane di polyvinyl difluoride (PVDF). Tali matrici sono state poi miscelate con albumina sierica bovina (BSA) al 2% in una soluzione salina fosfato tamponata (PBS) e unite con il siero dei cani in esame (1:100 nella soluzione BSA-PBS ad una concentrazione dell'1%). Successivamente è stato applicato un anticorpo secondario specifico (anticorpo anti IgG del cane di derivazione cunicola) ed in seguito ad incubazione, si è ottenuto lo sviluppo di una reazione di chemiluminescenza. Dopo tale reazione, le membrane sono state esposte ad un film radiografico e sviluppate (autoradiografia) (Rupp, 2013). L'intensità dello spot, previa scansione digitalizzata, è stata analizzata utilizzando un software di analisi di immagine (TotalLab image analysis software - Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) ed è stato espresso mediante unità di intensità arbitrarie (AIU).

Come popolazione di controllo, sono stati utilizzati i sieri di 19 cani non affetti da patologie neurologiche, prelevati da pazienti affetti presso l'Ospedale Didattico Veterinario dell'Università di Parma, sottoposti ad esame fisico generale ed esame neurologico. Tali campioni sono stati inviati per la ricerca anticorpale anti-gangliosidica e analizzati con le stesse metodiche dei precedenti.

5.5 INDAGINE STATISTICA

La comparazione dei dati ottenuti nella popolazione oggetto del presente lavoro, è stata effettuata utilizzando il test di chi-quadro o il Fisher exact test quando la popolazione era numericamente inferiore a 5 in uno dei due gruppi.

Nello specifico sono stati considerate le seguenti ipotesi statistiche, respingendole se $P \leq 0,05$:

- Nei soggetti con anticorpi anti-gangliosidi, il trattamento con Ig EV aumenta le probabilità di successo (miglioramento/guarigione vs decesso/non miglioramento)?
- Nel gruppo di studio la presenza di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* può essere associata alla presenza di anticorpi anti-gangliosidi?
- Nel gruppo di studio la presenza di anticorpi anti-*Neospora caninum* può essere associata alla presenza di anticorpi anti-gangliosidi?
- Nel gruppo di studio la presenza di anticorpi anti-*Ehrlichia canis* può essere associata alla presenza di anticorpi anti-gangliosidi?
- Nel gruppo di studio la presenza di anticorpi anti-*Leishmania infantum* può essere associata alla presenza di anticorpi anti-gangliosidi?
- Nel gruppo con presenza di anticorpi anti-gangliosidi, la presenza di anticorpi di un tipo, rispetto a quella di un altro tipo ha un valore prognostico (miglioramento/guarigione vs decesso/non miglioramento)?
- Nell'intero gruppo di studio la presenza di anticorpi anti-gangliosidi ha valore prognostico (miglioramento/guarigione vs decesso/non miglioramento)?
- Nel gruppo di studio, la presenza del trigger è associato alla presenza di anticorpi GA1/GM2?

CAPITOLO 6

6.1 RISULTATI

Come anticipato nel capitolo precedente, il presente lavoro ha preso in considerazione 26 cani con diagnosi clinica di poliradicoloneurite acuta idiopatica.

6.1.1 SEGNALAMENTO

Razza

Le razze di cani interessate dalla patologia sono risultate così composte (tabella 1):

- Meticcio: 30,76%, per un totale di 8/26;
- Pastore Tedesco: 11,53%, per un totale di 3/26;
- Labrador: 11,53%, per un totale di 3/26;
- Siberian Husky 7,69%, per un totale di 2/26;
- Altro: 38,46%, per un totale di 10/26 (1 caso per ciascuna razza di: Bracco Italiano, Pastore Australiano, Pastore Maremmano, Segugio, Jack Russell Terrier, Maltese, Shih-hitzu, Cocker Spaniel, Golden Retriever, Rottweiler).

Età

L'età media di insorgenza rilevata al momento di presentazione della malattia è stata 8 anni, con una mediana di 8, una deviazione standard di 3,58 ed un range che variava da 1 a 14 anni (Tab.1).

Sesso

La popolazione è risultata composta da 15 soggetti di sesso maschile e 11 femmine, corrispondenti rispettivamente al 57,69% e al 42,3% del totale (Tab. 1).

TAB. 1

CASO N°	SPECIE	RAZZA	SESSO	ETA'
1	Cane	Bracco Italiano	Maschio	4 anni
2	Cane	Pastore Australiano	Femmina	8 anni
3	Cane	Pastore Tedesco	Maschio	13 anni
4	Cane	Meticcio	Maschio	12 anni
5	Cane	Labrador	Maschio	8 anni
6	Cane	Pastore Maremmano	Maschio	8 anni
7	Cane	Meticcio	Maschio	14 anni
8	Cane	Segugio Italiano	Femmina	5 anni
9	Cane	Jack Russel Terrier	Maschio	10 anni
10	Cane	Maltese	Femmina	2 anni
11	Cane	Shih-htzu	Femmina	12 anni
12	Cane	Siberian Husky	Femmina	7 anni
13	Cane	Meticcio	Maschio	11 anni
14	Cane	Meticcio	Maschio	8 anni
15	Cane	Siberian Husky	Maschio	6 anni
16	Cane	Labrador	Maschio	13 anni

17	Cane	Meticcio	Maschio	8 anni
18	Cane	Cocker Spaniel	Femmina	1 anno
19	Cane	Golden Retriever	Maschio	10 anni
20	Cane	Meticcio	Femmina	6 anni
21	Cane	Labrador	Maschio	11 anni
22	Cane	Pastore Tedesco	Maschio	5 anni
23	Cane	Meticcio	Femmina	7 anni
24	Cane	Meticcio	Femmina	2 anni
25	Cane	Rottweiler	Femmina	6 anni
26	Cane	Pastore Tedesco	Femmina	11 anni

6.1.2 ANAMNESI

L'insorgenza della sintomatologia è avvenuto in maniera acuta in tutti i soggetti, con aggravamento dei segni clinici fino alla stabilizzazione in un periodo compreso tra le 12 e le 72 ore.

Il tempo intercorso tra l'insorgenza dei segni clinici e l'esecuzione della visita neurologica è variato da un minimo di 2 giorni a un massimo di 90 giorni, con una media di 15, una mediana di 10 e una deviazione standard di 19,54 giorni (Tab. 2).

Tab. 2

Caso	Tempo intercorso*	Alterazioni andatura	Alterazioni N. Cranici	Disfonia	Iper-estesia	Riflessi Spinali
1	10 giorni	Tetraparesi non deambul.	VII, X	Si	Si	Assenti 4 arti

2	9 giorni	Tetraparesi non deambul.	VII, X	Si		Diminuiti/ assenti 4 arti
3	8 giorni	Tetraparesi non deambul.				Diminuiti 4 arti
4	4 giorni	Tetraparesi deambulante	VII, X	Si		Diminuiti 4 arti
5	10 giorni	Tetraparesi non deambul.	VII, X,	Si		Diminuiti 4 arti
6	5 giorni	Tetraparesi non deambul.	V, X	Si		Diminuiti 4 arti
7	30 giorni	Paraparesi non deambul.	VII, X	Si		Diminuiti Arti Poster.
8	2 giorni	Tetraparesi deambulante	V, VII, X, XII,	Si		Diminuiti 4 arti
9	3 giorni	Tetraparesi non deambul.	VII, X	Si		Diminuiti/ assenti 4 arti
10	60 giorni	Tetraparesi deambulante	V, VII, XII,			Diminuiti 4 arti
11	21 giorni	Tetraparesi deambulante	V, XII, X	Si		Diminuiti 4 arti
12	3 giorni	Tetraparesi non deambul.	VII, X, XII	Si		Diminuiti/ assenti 4 arti
13	11 giorni	Tetraplegia	VII, X	Si		Assenti 4 arti

14	10 giorni	Tetraparesi non deambul.	V, X, VII, XII,	Si		Diminuiti/assenti 4 arti
15	8 giorni	Tetraparesi non deambul.			Si	Diminuiti/assenti 4 arti
16	90 giorni	Tetraparesi deambulante	V, VII		Si	Diminuiti/assenti 4 arti
17	23 giorni	Tetraparesi deambulante	X	Si		Diminuiti/assenti 4 arti
18	7 giorni	Tetraplegia	VII, X	Si	Si	Diminuiti/assenti 4 arti
19	3 giorni	Tetraparesi deambulante				Diminuiti/assenti 4 arti
20	10 giorni		V, X, XII, IX, XI			Normali
21	10 giorni	Tetraplegia	X, VII,	Si		Assenti 4 arti
22	2 giorni	Tetraparesi non deambul.				Diminuiti 4 arti
23	1 giorno	Tetraparesi non deambul.			Si	Diminuiti 4 arti
24	20 giorni	Tetraparesi non deambul.				Diminuiti 4 arti
25	10 giorni	Tetraparesi non deambul.				Diminuiti 4 arti

26	15 giorni	Tetraparesi deambulante				Diminuiti 4 arti
-----------	-----------	----------------------------	--	--	--	---------------------

***Tempo intercorso tra l'insorgenza dei segni clinici e l'esecuzione della visita neurologica**

Nei giorni antecedenti l'insorgenza della sintomatologia, l'anamnesi ha rilevato in 9 pazienti l'esposizione a potenziali trigger, intesi come possibili fattori predisponenti all'instaurarsi di un'aberrante reazione del sistema immunitario, come precedentemente illustrato nel capitolo 3 e descritto nella seguente tabella 3.

TAB. 3

CASO N°	POTENZIALE TRIGGER	TEMPO INTERCORSO*
2	Infezione uterina	24 giorni
7	Infezione respiratoria	30 giorni
8	Infezione gastroenterica	37 giorni
11	Infezione gastroenterica	25 giorni
18	Infezione gastroenterica	20 giorni
19	Infezione gastroenterica	14 giorni
20	Infezione respiratoria	2 giorni
22	Vaccinazione	12 ore
26	Parto e successivo allattamento	20 giorni

*** Tempo intercorso tra il potenziale trigger e l'insorgenza della sintomatologia neurologica**

6.1.3 ESAME OBIETTIVO GENERALE

L'esame obiettivo generale non ha evidenziato alterazioni degne di significato clinico in alcun paziente, fatta eccezione per quelle alterazioni di trofismo e tono muscolare e segni e atteggiamenti particolari riportate nelle specifiche parti dell'esame neurologico. La temperatura è risultata nei limiti della norma in tutti i pazienti.

6.1.4 ESAME NEUROLOGICO

I segni clinici predominanti sono stati quelli di alterazioni dell'andatura, descritte in 25 soggetti, mentre in un paziente si è osservato un interessamento multiplo di numerosi nervi cranici. Il cane è stato incluso nello studio perché classificato come affetto da poliradicoloneurite idiopatica acuta dei soli nervi cranici.

Dei 25 cani con alterazioni deambulatorie, in 24 è stato rilevato un interessamento di tutti e 4 gli arti, mentre in un caso erano colpiti solo gli arti posteriori. Nello specifico si è osservata la presenza di tetraplegia flaccida in 3 cani, tetraparesi non deambulante in 13, tetraparesi deambulante in 8, paraparesi non deambulante in un solo soggetto (Tab. 3).

L'esame clinico ha documentato in 16 casi, un concomitante coinvolgimento di uno o molteplici nervi cranici (Tab. 3). In quattro casi (#8, #10, #12, #20), l'esame elettrodiagnostico si è rivelato utile per svelare l'interessamento del Nervo Trigemino (#8), del Nervo Accessorio (#20), e del nervo Ipoglosso (#8, #10, #12) che clinicamente sono apparsi normali o, come nel caso del Nervo Accessorio, la valutazione clinica non risulta attuabile.

Nella popolazione oggetto del presente studio, i nervi cranici affetti sono risultati i seguenti:

- Nervo vago (X nervo cranico) in 16 soggetti;
- Nervo facciale (VII nervo cranico) in 14 casi;

- Nervo trigemino (V nervo cranico) in 7 soggetti;
- Nervo ipoglosso (XII nervo cranico) in 6 soggetti;
- Nervo glossofaringeo (IX nervo cranico) in 1 paziente;
- Nervo Accessorio (XI nervo cranico) in 1 caso.

L'assenza o l'alterazione della voce (afonia/disfonia), è stata riscontrata in 15 casi, mentre in 5 è stata documentata la presenza di iperestesia a livello della muscolatura epiassiale.

In 3 cani i riflessi spinali sono risultati assenti nei 4 arti, in 13 casi si sono rivelati diminuiti in maniera diffusa nei 4 arti, mentre in 9 soggetti si è rilevata la presenza di una diminuzione dei riflessi flessori dei 4 arti e l'assenza del riflesso patellare bilateralmente. Nel cane affetto da poliradicoloneurite dei soli nervi cranici, i riflessi spinali sono risultati nella norma (Tab. 3).

6.1.5 TERAPIA

In 20 cani non è stata impostata alcuna terapia farmacologica. In 3 sono state somministrate Immunoglobuline umane, mentre in 3 altri pazienti è stata somministrata una terapia antibiotica, precisamente la doxiciclina in 2 e l'enrofloxacin in uno. I dosaggi e i tempi impiegati per la terapia sono schematizzati nella Tabella 4.

Tab. 4

Caso	Terapia somministrata	Dose e via di somministrazione	Durata
9	Ig Vena	1g/kg/die per via endovenosa	2 giorni
12	Ig Vena	1g/kg/die per via endovenosa	2 giorni
15	Ig Vena	1g/kg/die per via endovenosa	2 giorni

23	Doxiciclina (Vibravet ^R)	10 mg/kg/die per via orale	20 giorni
24	Doxiciclina (Vibravet ^R)	10 mg/kg/die per via orale	20 giorni
25	Enrofloxacin (Baytril ^R)	5 mg/kg/die per via orale	5 giorni

6.1.6 DECORSO

I casi #14 e #18 sono deceduti dopo pochi giorni dalla diagnosi per la presenza di una paralisi dei muscoli respiratori. I 24 casi sopravvissuti sono stati tutti sottoposti a trattamento fisioterapico entro una settimana dalla presentazione alla visita neurologica e in 23 è stato notato un iniziale miglioramento entro un mese dalla diagnosi, mentre nel caso #23, sono stati osservati dei miglioramenti dopo 2 mesi dalla diagnosi.

In 22/24 soggetti si è assistito ad una completa guarigione entro 3 mesi. In un caso (#1), dopo aver assistito ad un miglioramento iniziale, si è perso il follow up a 3 mesi, mentre nel caso #23 il cane, seppure moderatamente migliorato, a sei mesi di distanza continuava a presentare una moderata tetraparesi deambulante.

I pazienti che hanno ricevuto la terapia con Ig umane non hanno evidenziato particolari differenze nei tempi di miglioramento rispetto agli altri.

6.2 DETERMINAZIONE TITOLI ANTICORPALI DI AGENTI INFETTIVI

Sui sieri di tutti i soggetti è stata eseguita l'indagine anticorpale diretta verso diversi agenti infettivi, come descritto nel capitolo precedente, ottenendo in 10 casi una positività ad almeno 1 tra gli agenti eziologici testati, che vengono riportati in maniera più dettagliata di seguito e nella Tab. 5:

- *Toxoplasma gondii* 26,92% (7/26)
- *Neospora caninum* 11,53% (3/26)

- *Ehrlichia canis* 11,53% (3/26)
- *Leishmania infantum* 11,53 % (3/26)

Tab. 5

Caso	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Leishmania infantum</i>
3	IgG 1:80	Negativo	Negativo	Negativo
4	IgG 1:80	IgG 1:40	Negativo	Negativo
8	Negativo	IgG 1:640	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	IgG 1:640	Negativo
14	IgG 1:40	Negativo	Negativo	Negativo
21	IgG 1: 160	Negativo	Negativo	Negativo
22	IgG 1:40	Negativo	Negativo	IgG 1:40
23	IgG 1:40	IgG 1:40	IgG 1:40	Negativo
24	IgG 1:40	Negativo	IgG 1:160	IgG 1:1280
26	Negativo	Negativo	Negativo	IgG 1:160

6.3 INDAGINI ELETTRODIAGNOSTICHE

Le indagini elettrodiagnostiche sono state eseguite su 20 pazienti e 19/20 hanno evidenziato attività muscolare spontanea generalizzata, con potenziali di fibrillazione e onde a fronte ripido più evidente nella muscolatura appendicolare distale, e una velocità di conduzione nervosa diminuita; tali risultati hanno supportato la diagnosi di poliradicoloneurite acuta idiopatica.

Il tempo intercorso tra l'insorgenza della sintomatologia e l'esecuzione dei test elettrodiagnostici è variato da un minimo di 2 giorni, ad un massimo di 90 giorni, con una media di 18, una mediana di 10 e una deviazione standard di 21,87.

La velocità di conduzione motoria nervosa (MNCV) tibiale è variata da un minimo di 30.4 a un massimo di 65 m/sec (media 48 ; mediana 49,1), risultando diminuita in 8 casi (40%) e normale nei restanti 12 soggetti (60%). In tutti i casi in cui la MNCV è risultata normale, si è rilevata un'ampiezza del potenziale d'azione muscolare composito (CMAP) diminuita, mentre nei cani che hanno presentato una MNCV diminuita, l'ampiezza dei CMAP è risultata normale in 3 pazienti (#11, #16#,19) e diminuita nei restanti 5 soggetti.

La velocità di conduzione sensitiva tibiale è stata misurata in 14 cani, ed è risultata compresa tra 36,3 e 78 m/sec (media 53; mediana 54,2). Si è rilevata una diminuzione dell'ampiezza del CMAP in 18 cani (90%), mentre la dispersione dei CMAPs si è verificata in 10 casi (50%). Il potenziale d'azione sensitivo (SNAPs), misurato in 14 soggetti, è risultato diminuito in 3 casi (21%), ha presentato un'ampiezza ridotta in 2 soggetti (14%) e ha evidenziato una dispersione in 2 casi (14%).

In tutti i casi è stata evidenziata una latenza prolungata dell'onda F, tranne nei casi #14 e #18 dove l'onda F non è stata registrata perché assente.

In sintesi, in 8 cani i risultati elettrodiagnostici sono stati indicativi di lesioni prevalentemente demielinizzanti (40%), mentre in 12 (60%) si è riscontrato primariamente un danno assonale, che nel dettaglio ha coinvolto esclusivamente la componente motoria in 8 casi (67%), sia la motoria che la sensitiva in 4 casi (33%).

Nella Tabella 6 sono indicati i tempi di esecuzione e le principali alterazioni riscontrate in ciascun paziente sottoposto ad esame elettrodiagnostico.

Tab. 6

CASO N°	TEMPO ED*	ALTERAZIONI RISCONTRATE			
		EMG**	MNCV***	SNCV*****	ONDE F
1	10 giorni	Fibrillazioni PSW	48,6 m/s (Diminuito) No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	NR	Latenza Prolung

2	9 giorni	Fibrillazioni PSW	48,1 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	68,7 m/s No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
3	8 giorni	Fibrillazioni PSW	34 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	42,2 m/s Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
4	9 giorni	Fibrillazioni PSW	65 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	73,9 m/s No Dispersione SNAPs	Assente
5	10 giorni	Fibrillazioni PSW	58 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	NR	Latenza Prolung
6	5 giorni	No Fibrillazioni	57,3 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	NR	Latenza Prolung
7	36 giorni	Fibrillazioni PSW	53,5 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	36,4 m/s (Dimin) No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
8	2 giorni	Fibrillazioni PSW	63,4 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	42,5 m/s (Dimin) No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
9	3 giorni	Fibrillazioni PSW	61,5 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	50 m/s No Dispersione Amp SNAPs dimin	Latenza Prolung
10	60 giorni	Fibrillazioni PSW	59,1 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	54,2 m/s No Dispersione Amp SNAPs dimin	Latenza Prolung
11	21 giorni	Fibrillazioni PSW	45,3 m/s (Diminuito) No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP norm	50 m/s No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
12	3 giorni	Fibrillazioni PSW	49,1 m/s Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	57,1 m/s Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
13	11 giorni	Fibrillazioni PSW	30,4 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs	NR	Latenza Prolung

			Ampiezza CMAP dimin		
14	10 giorni	Fibrillazioni PSW	53,7 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	72,7 m/s No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
15	8 giorni	Fibrillazioni PSW	54,9 m/s Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	59,5 m/s No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
16	90 giorni	Fibrillazioni PSW	41,7 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP norm	NR	Latenza Prolung
17	30 giorni	Fibrillazioni PSW	60,9 m/s Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	78 m/s No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung
18	7 giorni	Fibrillazioni PSW	32,8 m/s Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	73,1 m/s No Dispersione SNAPs	Assente
19	20 giorni	Fibrillazioni PSW	45 m/s (Diminuito) Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP norm	NR	Latenza Prolung
21	10 giorni	Fibrillazioni PSW	42,6 m/s No Dispersione CMAPs Ampiezza CMAP dimin	36,3 m/s (Dimin) No Dispersione SNAPs	Latenza Prolung

LEGENDA:

*giorni intercorsi tra l'insorgenza dei sintomi neurologici e l'esecuzione dell'elettrodiagnostica

**EMG: Elettromiografia

***MNCV: Velocità di conduzione nervosa motoria

****SNCV: Velocità di conduzione nervosa sensitiva

PSW: positive sharp wave (onde positive a fronte ripido)

CMAPs: compound muscular action potentials (potenziale d'azione muscolare composto)

SNAPs: sensitive nervous action potentials (potenziale d'azione sensitivo)

6.4 INDAGINE ISTOPATOLOGICA: Biopsia Muscolare

La biopsia muscolare, eseguita su 4 cani, ha mostrato un quadro caratterizzato da atrofia angolare diffusa compatibile con una atrofia muscolare neurogena, contribuendo a consolidare la diagnosi finale di poliradicoloneurite idiopatica.

6.5 ESAME DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE

L'esame del liquido cerebrospinale è stato eseguito su due cani, e ha evidenziato esclusivamente un aumento della concentrazione proteica, senza variazioni nella conta cellulare.

6.6 ANALISI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI GM2 E GA1

Tutti e 26 i cani sono stati testati per la ricerca di Anticorpi Anti-Gangliosidi utilizzando la metodica della glicarray come precedentemente descritto nel capitolo 5. Si è ottenuta la positività anticorpale in 17/26 (65%) soggetti, ed in modo esclusivo solo contro i GM2 e GA1 con una diluizione di 1:100.

Nello specifico, 14/17 (82%) presentavano una positività per gli anticorpi Anti-GM2, 2/17 (12%) avevano anticorpi Anti-GA1 e in un caso (1/17) (6%) era positivo per entrambi (Tab. 5).

Sono risultati invece negativi 7/17 (41%) pazienti, mentre in 2/17 (12%) gli esiti sono stati dubbi, ovvero si è ottenuta la positività nel primo test e la negatività nel successivo o viceversa.

I dati analitici sono schematizzati nella Tabella 7, che riporta inoltre la concomitanza o meno di un titolo anticorpale positivo verso gli agenti infettivi testati e la presenza di un potenziale trigger

TAB. 7 – Indagine anticorpale Anti-Gangliosidi

CASO N°	RISULTATO GLICOARRAYS	ANTICORPI AGENTI INFETTIVI	TRIGGER
1	POSITIVO Anti GM2		

2	POSITIVO Anti GM2		Si
3	Negativo	<i>Toxoplasma</i>	
4	POSITIVO Anti GM2	<i>Toxoplasma, Neospora</i>	
5	POSITIVO Anti GM2		
6	POSITIVO Anti GM2		
7	POSITIVO Anti GM2		Si
8	Negativo	<i>Neospora</i>	Si
9	POSITIVO Anti GM2		
10	POSITIVO Anti GM2		
11	Negativo		Si
12	POSITIVO Anti GM2		
13	Negativo	<i>Ehrlichia</i>	
14	POSITIVO Anti GA1	<i>Toxoplasma</i>	
15	POSITIVO Anti GM2		
16	Negativo		
17	POSITIVO Anti GM2		
18	POSITIVO Anti GM2		Si
19	POSITIVO Anti GM2		Si
20	Negativo		Si
21	POSITIVO Anti GM2	<i>Toxoplasma</i>	
22	Dubbio	<i>Toxoplasma, Leishmania</i>	Si
23	POSITIVO Anti GM2 e GA1	<i>Neospora, Ehrlichia, Leishmania</i>	

24	Dubbio	<i>Toxoplasma, Ehrlichia</i>	
25	Negativo		
26	POSITIVO Anti GM2	<i>Leishmania</i>	Si

Tra i soggetti che hanno evidenziato la presenza di anticorpi anti-gangliosidi, due sono deceduti per la presenza di paralisi respiratoria e sono risultati rispettivamente positivi uno per gli anticorpi anti- GA1 e l'altro anti- GM2 (Casi rispettivamente: #14, #18); quelli sopravvissuti hanno mostrato un miglioramento entro 1 mese dall' inizio della sintomatologia eccetto i casi #10, #17 e #23, che hanno presentato un principio di miglioramento solo dopo un mese dall'insorgenza della malattia. Tra questi, nei primi due sono stati rilevati gli anticorpi anti-GM2, mentre il caso #23 ha evidenziato una duplice positività ad entrambi gli anticorpi, anti-GM2 e GA1.

Dei 10 cani che hanno evidenziato una positività sierologica contro gli agenti infettivi testati, in 3 sono stati riscontrati gli anticorpi anti-GM2 (Casi: #4, #21, #26), in 2 l'indagine ha dato un risultato dubbio (Casi: #22, #24), in uno si sono evidenziati quelli anti-GA1 (Caso #14), in un altro si è verificata la doppia positività (Caso #23), mentre i restanti 3 caso sono risultati negativi(Casi: #3, #8, #13). Nello specifico si sono ottenuti i seguenti risultati, riportati anche nella tabella 7:

- Nei pazienti risultati positivi per *Toxoplasma gondii* (n=7) si sono evidenziati gli anticorpi Anti-GM2 in 2 casi, Anti-GA1 in un caso, sono risultati dubbi in 2 casi e negativi in un altro (#3).
- I soggetti in cui è stata riscontrata la positività per *Neospora caninum* (n=3) hanno presentato gli anticorpi anti-GM2 in un soggetto, sia anti-GM2 che anti-GA1 in un altro, mentre un caso è risultato negativo.
- I soggetti positivi per *Ehrlichia canis* (n=3) hanno evidenziato la presenza di anticorpi sia anti- GM2 che anti-GA1 in un paziente, dubbi in un altro e nessun anticorpo in un altro soggetto.
- La positività anticorpale alla *Leishmania infantum* (n=3) è stata invece associata alla presenza di anticorpi dubbi in due cani, e anticorpi anti-GM2 in un altro caso.

Degli 8 cani che avevano presentato una precedente esposizione ad un potenziale trigger, 3 non hanno evidenziato la presenza di anticorpi anti gangliosidi, mentre i restanti 5 sono risultati positivi agli anticorpi anti-GM2 (tab. 7).

6.7 INDAGINE STATISTICA

I risultati dell'analisi statistica hanno evidenziato che:

- la presenza di anticorpi anti GA1/GM2 nei soggetti con poliradicoloneurite trattati con Immunoglobuline endovenose non è associata ad una prognosi peggiore (p = 0 .96)
- la presenza di anticorpi anti GA1/GM2 non è associata ad una prognosi peggiore nei pazienti sierologicamente positivi per:

- *Toxoplasma gondii* ($p=0.94$)
 - *Neospora caninum* ($p=0.55$)
 - *Ehrlichia canis* ($p=0.26$)
 - *Leishmania infantum* ($p=0.26$)
- Non si è ottenuta una prognosi peggiore sulla base del diverso anticorpo antigangliosidico riscontrato ($p=0.10$)
 - La presenza degli anti GM2/GA1 non è stata associata a prognosi peggiore ($p=0.49$)
 - La presenza degli anti GM2/GA1 non è stata associata a prognosi peggiore nei pazienti che presentavano un trigger ($p=0.67$)

6.8 GRUPPO DI CONTROLLO

Dei 21 Sieri di cani non affetti da poliradicoloneurite idiopatica acuta, utilizzati come popolazione di controllo per l'indagine anticorpale antigangliosidica, 20/21 sono risultati negativi. L'unico caso positivo ha evidenziato la presenza di anticorpi anti-GM2.

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE

La Poliradicoloneurite acuta idiopatica del cane (ACIP) è una patologia la cui diagnosi presenta non poche difficoltà attuative ed avviene “per esclusione” di altre possibili cause.

Per consolidare le conoscenze di questa malattia, il presente progetto di ricerca si è posto l’obiettivo di descrivere i principali aspetti clinici e diagnostici dell’ ACIP in 26 cani risultati affetti dalla malattia.

Verranno di seguito discusse le caratteristiche sintomatologiche, l’evoluzione clinica e i risultati degli esami diagnostici, in particolare elettrodiagnostici, confrontandoli con quanto riportato in letteratura. Si commenteranno inoltre i risultati relativi all’esposizione verso specifici agenti infettivi (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Ehrlichia canis*, *Leishmania infantum*), o altri fattori (come vaccinazioni, infezioni gastroenteriche e così via) per valutarne un possibile ruolo come fattori scatenanti per l’instaurarsi della patologia. Infine si procederà alla discussione dei risultati relativi la ricerca anticorpale anti-gangliosidica, per validarne l’utilità ai fini diagnostici anche in medicina veterinaria, così come avviene per alcune forme della Sindrome di Guillain-Barrè umana e valutare se tali malattie possano essere pertanto assimilate non solo dal punto di vista clinico, ma anche da quello patogenetico.

7.1 ASPETTI CLINICI

I 26 casi oggetto del presente lavoro, affetti da una ACIP documentata nel periodo compreso tra il 2008 e il 2012, non riflettono la reale diffusione della malattia in Italia. Tale numero infatti appare sottostimato per la necessità di escludere dallo studio, i numerosi casi non completamente documentati. Tale mancanza è in parte legata alle

caratteristiche intrinseche della presente tesi e a quelle proprie della patologia. Infatti da un lato, la presenza di un lavoro retrospettivo, ha posto dei limiti nella selezione dei pazienti in grado di soddisfare i criteri di inclusione (come ad esempio la disponibilità di siero adeguatamente stoccato), mentre dall'altro, il proprietario ha spesso declinato l'esecuzione delle indagini diagnostiche a fronte di un miglioramento più o meno rapido in assenza di terapie.

SEGNALAMENTO – Nei dati riportati in letteratura, non viene menzionata alcuna particolare predisposizione di *razza* per l'ACIP (Braund, 2003; de Lahunta 2009; Cuddon, 2002; Bernardini, 2002). Anche nell'analisi dettagliata di alcuni lavori degli ultimi vent'anni, che hanno esaminato una casistica più cospicua, sono stati ottenuti dei dati bibliografici in cui non è emersa una particolare predisposizione di razza. Nello specifico, nel lavoro di Holt e colleghi del 2011, in cui sono stati esaminati 44 casi di sospetta ACIP, è stata evidenziata una maggiore rappresentazione del cane da caccia al procione (18%), seguito dal pastore tedesco (14%). Invece la popolazione esaminata da Hirschvogel e colleghi nel 2012, composta da 16 cani, ha evidenziato una maggiore prevalenza della razza meticcica (25%), mentre nello studio di Cuddon del 1998, in cui sono stati valutati 12 cani, il beagle, il labrador e il pastore tedesco sono risultate le razze maggiormente rappresentate, con ciascuno una percentuale del (17%).

In accordo con quanto appena riportato, anche nel presente studio non sono emerse particolari predisposizioni di razza, seppure vi sia stata un'ampia rappresentazione del gruppo dei meticci (30,76%).

L'*età* rilevata al momento della comparsa della malattia è apparsa eterogenea all'interno del gruppo, con una maggiore distribuzione nei soggetti sopra i 5 anni di età. Potremmo pertanto dedurre che anche nel nostro studio, così come risulta descritto in bibliografia (Vite, 2003), l'ACIP tende a colpire cani adulti o anziani, seppure sia

possibile osservarla con minore frequenza anche nei giovani adulti. Nonostante il riscontro di tale patologia in cani al di sotto dell'anno di età sia poco frequente (Bernardini, 2010), si ricorda tuttavia che in bibliografia sono stati descritti dei casi anche in cuccioli di poche settimane di vita (Charteris, 1988, Gehring et al, 2001).

In accordo con quanto riportato in letteratura (Bernardini M, 2010), non è stata riscontrata particolare predisposizione di *sesso* all'interno della popolazione canina oggetto del nostro studio.

ANAMNESI – Come viene descritto in letteratura, in cui si segnala un'insorgenza acuta della sintomatologia, seguita da una progressione dei segni clinici, che di norma si verifica in 5 o in alcuni casi 10 giorni (Cuddon, 2002), la comparsa della sintomatologia è avvenuta in maniera acuta, con aggravamento dei segni clinici in meno di 6 giorni in tutti i soggetti oggetto del presente lavoro. E' stato riscontrato un intervallo di tempo molto ampio tra l'insorgenza dei sintomi e la presentazione alla visita neurologica specialistica che in alcuni casi ha superato addirittura il mese. Questo fenomeno è di difficile interpretazione, in quanto tale patologia si è accompagnata, nella maggior parte dei soggetti, a dei vistosi deficit deambulatori, che in molti casi ne impedivano la locomozione, ma potrebbe essere spiegato con un problema di natura economica da parte del proprietario, che talvolta può limitare o posticipare l'approfondimento di questa patologia.

Secondo l'opinione condivisa da numerosi studiosi (Cuddon, 2002; Braund, 2003; Holt, 2011; Rupp, 2013), si sospetta l'esistenza di un meccanismo di *molecular mimicry* alla base della malattia, ovvero una risposta aberrante aspecifica da parte del sistema immunitario, scatenata da un antigene esterno, ma diretta contro le componenti assonali o il rivestimento mielinico come descritto nel capitolo 3.

In letteratura è stata riportata la possibilità di un'esposizione nei 7-14 giorni l'insorgenza della sintomatologia dell'ACIP, a potenziali fattori (trigger), come ad esempio la saliva del procione o infezioni del tratto respiratorio o gastroenterico, in

grado di scatenare la reazione immunitaria sopra descritta, ipoteticamente responsabile dell'instaurarsi della patologia (Cuddon, 2002). Sulla base di tali dati, nel presente studio è stata posta particolare attenzione alla presenza in anamnesi di possibili trigger nel periodo (fino a 6 settimane) antecedente l'insorgenza dei segni clinici. I trigger sono stati determinati tali se potevano essere in grado di agire come antigeni, potenzialmente in grado di stimolare il sistema immunitario, avvalendosi dei dati ottenuti dalla letteratura della medicina umana sulla GBS. Infatti secondo alcuni studi, la GBS è stata associata ad una precedente infezione del tratto gastroenterico o respiratorio, e l'infezione più comune è stata causata dal *Campylobacter jejuni* o dal *Citomegalovirus*, mentre nel 60% dei casi non si è trovato alcun fattore scatenante. All'interno di questa percentuale sono stati ipotizzati altri fattori scatenanti, in virtù dei dati epidemiologici, come i vaccini influenzali o altri agenti patogeni (Yuki, 2008; Sivadon-Tardy, 2009; Orlikowski, 2011). Nel presente lavoro è stata evidenziata la pregressa esposizione a diversi trigger in un terzo della popolazione (35%), rappresentati prevalentemente da infezioni gastroenteriche (44%) e secondariamente da infezioni respiratorie (22%). Negli studi effettuati in medicina veterinaria, non vi è un'ampia trattazione dell'esposizioni ad eventuali trigger; il contributo più consistente deriva dallo studio di Holt del 2011, in cui è stata valutata la sieroprevalenza di determinati agenti infettivi in 44 soggetti, sospettandoli come potenziali trigger; tale studio verrà discusso più avanti, con la trattazione degli agenti infettivi. In due studi è stata sospettata invece una correlazione con una precedente vaccinazione (Chetboul V, 1989; Gehring R, 2001).

ESAME FISICO - Per quanto l'ACIP sia una malattia generalizzata del sistema neuromuscolare, in grado di compromettere secondariamente altri organi e apparati, come nel caso delle polmoniti ab ingestis in corso di megaesofago, tutti e 26 i cani considerati non hanno riportato particolari alterazioni all'esame fisico, se non per

quelle discusse in dettaglio nell'analisi dei risultati dell'esame neurologico. In letteratura non sono state riportate particolari alterazioni concomitanti di organi e apparati diversi da quello nervoso. In una review del 2002 viene sottolineato come, seppure le grandi funzioni organiche siano mantenute, talvolta sia possibile osservare una ritenzione urinaria nei primissimi giorni della malattia (Cuddon, 2002).

ESAME NEUROLOGICO - La caratteristica clinica delle sindromi neuromuscolari è rappresentata dalla paresi, intesa come deficit motorio che si esprime secondo diversi gradi di gravità: dalla semplice debolezza con intolleranza all'esercizio, fino all'incapacità della deambulazione e al decubito permanente (Braund, 2003; Cuddon, 2002). Anche nella casistica oggetto del presente lavoro, si è evidenziata una prevalenza dei deficit di andatura in 25 dei 26 casi esaminati. Si è assistito ad un coinvolgimento dei 4 arti nella maggior parte dei soggetti (96%), ma occorre sottolineare come in un caso vi sia stato l'interessamento dei soli arti posteriori, senza l'estensione agli anteriori, come invece tipicamente riportato in letteratura (Cummings et al, 1982, Cuddon, 2002). Analizzando in maniera approfondita la popolazione sottoposta ad indagini elettrodiagnostiche, oggetto di un lavoro del 1998 (Cuddon, 1998) si è rilevata la presenza anche in tale studio di un cane affetto da ACIP con paraplegia. Secondo diversi testi bibliografici e lavori scientifici, la sintomatologia dell'ACIP è caratterizzata da una tetraparesi che tende a evolvere verso la tetraplegia (Cuddon, 1998; de Lahunta, 2003; Bernardini 2010). In una review del 2002 (Cuddon, 2002) è segnalata l'evenienza di una sintomatologia più lieve, caratterizzata da movimenti volontari dei 4 arti, che non evolve in tetraplegia, senza però espliciti riferimenti alla possibilità di un'attività deambulatoria autonoma da parte del paziente. Nel presente studio è stata rilevata una tetraparesi deambulante nel 31% della popolazione, che non è stata seguita da un aggravamento dei sintomi clinici. Tale dato appare notevolmente interessante, sulla base di uno scarso contributo letterario al riguardo e trova riscontro in una segnalazione molto datata, del 1974, in cui è stata

descritta una lieve forma sintomatologia di ACIP, e in un lavoro del 2003, in cui si accenna alla presenza di sintomatologie caratterizzate da deficit motori lievi o che possono coinvolgere solo di alcuni gruppi muscolari (Braund, 2003).

In un altro lavoro invece, è stata rilevata una sintomatologia caratterizzata da tetraparesi deambulante nel 17% dei casi (Cuddon, 1998), ma in tali casi i soggetti sono stati esaminati a soli 2 giorni dall'insorgenza della sintomatologia, senza una successiva documentazione avvenuta durante il decorso, che come suggerito dalla letteratura (Cuddon, 2002; Braund, 2003), potrebbe essere evoluto verso un peggioramento entro 5-10 giorni dall'esordio dei sintomi clinici.

In tutti i casi esaminati, è stata osservata una diminuzione o assenza dei riflessi spinali, in concomitanza ad un'ipotonia e ipotrofia muscolare generalizzata. Questi dati trovano consenso con quanto pubblicato nei diversi testi bibliografici (Cuddon, 2002; Braund, 2003; de Lahunta, 2009; Bernardini 2010).

Numerosi pazienti hanno manifestato un concomitante coinvolgimento dei nervi cranici. Secondo la letteratura, tale riscontro appare poco frequente e di solito interessa il solo nervo facciale e/o il vago, il cui deficit si esprime sovente con la sola presenza di afonia o disfonia (Cuddon, 2002); solo di rado sono possibili delle alterazioni anche a carico degli altri nervi cranici (Cumings et al, 1982; Northington e Brown, 1982; McKhann et al., 1991; van Doorn et al., 2008). In un lavoro del 2012 in cui è stata elencata la sintomatologia neurologica rilevata al momento della visita neurologica, è stato possibile riscontrare su di una popolazione totale di 30 cani, un coinvolgimento dei nervi cranici, rappresentato dal nervo vago e dal nervo facciale, nel 47% dei casi, con una prevalenza del nervo vago nel 40% dei soggetti. Tali dati non sono stati ulteriormente posti in relazione con gli esami elettrodiagnostici (Hirschvogel, 2012). Nel presente lavoro, sono state documentate delle alterazioni dei nervi cranici nel 62% dei pazienti, con una prevalenza del nervo vago nel 100% dei soggetti con disfunzioni dei nervi cranici e del nervo facciale nell'88% dei casi; è stato rilevato inoltre anche un coinvolgimento del nervo trigemino (nel 44% dei casi) e del nervo ipoglosso (nel

38% dei casi). L'alterazione del nervo vago e del nervo facciale è stata rilevata clinicamente in tutti i soggetti, mentre dal punto di vista clinico il coinvolgimento del nervo trigemino e del nervo ipoglosso è stato evidenziato rispettivamente nel 86% e nel 50% dei casi. L'esame elettrodiagnostico ha confermato la disfunzione in tutti i casi clinicamente manifesti, evidenziando inoltre, in quelli in cui non vi è stato un riscontro clinico, un coinvolgimento del nervo trigemino nel 14% dei casi, del nervo ipoglosso nel 50% dei casi, del nervo accessorio e del nervo glossofaringeo nel 100% dei casi. In sintesi nel 75% dei casi la sintomatologia, legata alla disfunzione di tali nervi è stata evidenziata clinicamente, mentre nel 25% dei soggetti, l'alterazione di alcuni nervi cranici, è stata evidenziata solo attraverso le indagini elettrodiagnostiche. Questi dati acquistano una notevole importanza, alla luce di una possibile sottostima della reale diffusione neuromuscolare della malattia nei dati bibliografici, in quanto non sempre i casi documentati in passato, sono stati sottoposti ad indagini elettrodiagnostiche complete.

In medicina umana è stata riportata sporadicamente, in correlazione o meno con la sindrome di Guillain-Barré (Munsat e Barnes, 1965), una poliradicolopatia con un coinvolgimento dei soli nervi cranici, che sembrerebbe interessare in particolare il terzo e il settimo nervo cranico (Iwasaki e Kinoshita, 1989). La paralisi ad insorgenza acuta ad eziologia non identificata del settimo nervo cranico, è stata descritta come sindrome umana a se stante, con il nome di paralisi di Bell's (Knox, 1998). In un lavoro del 2002 (Gilbert, 2002) è stata però successivamente evidenziata nella stessa sindrome, la presenza di un coinvolgimento anche delle porzioni sensitive e motorie di altri nervi cranici, quali il V, VIII, IX e X, che hanno portato allo sviluppo di una sintomatologia più ampia, comunque riferibile alle alterazioni degli stessi nervi coinvolti. Nello stesso studio, è stata sospettata una possibile causa virale (Herpes Zoster). In medicina veterinaria, il coinvolgimento dei soli nervi cranici come forma di poliradicoloneurite idiopatica acuta è documentata solo sporadicamente e l'ipotesi di una possibile correlazione con la sindrome umana non è stata del tutto chiarita

(Braund et al, 1979; Kern e Erb, 1987). Secondo alcuni autori la possibilità di un'infezione latente da herpes-virus 1, potrebbe causare una sindrome vestibolare transitoria (Parzefall et al, 2010) e sulla base di queste considerazioni, un altro studio recente, ha ipotizzato una correlazione tra 7 cani affetti da una polineuropatia acuta idiopatica dei nervi cranici, e un'eziologia virale, ponendo un'ipotetica correlazione con quello che accade nella corrispondente paralisi di Bell (Motta et al, 2011). In entrambi gli ultimi lavori, vi era però la presenza di una sintomatologia riferibile soprattutto alla disfunzione del nervo vestibolare, mentre nel caso preso in esame nel presente studio, non vi è stato alcun coinvolgimento dell'ottavo nervo cranico. Sulla base del segnalamento nel Nord Europa di alcune polineuriti che colpiscono i soli nervi cranici (Sigitas Cizinauskas, comunicazione personale), è verosimile, pertanto, considerare anche il caso sopra citato, come affetto da poliradicoloneurite/polineurite idiopatica dei nervi cranici.

La maggior parte dei soggetti sono guariti indipendentemente dalla gravità o meno dei segni clinici. Lo stesso discorso si sovrappone anche per i 2 cani deceduti per complicazioni respiratorie (#14 e #18), le quali si possono presentare nel 12% dei cani affetti da poliradicoloneurite acuta idiopatica (Hirschvogel et al, 2012). Tali pazienti hanno manifestato rispettivamente una tetraparesi con riflessi diffusamente diminuiti, e una tetraplegia con riflessi patellari assenti e flessori diminuiti. Entrambi sono stati sottoposti alla visita neurologica con una sintomatologia in atto da oltre una settimana, accompagnati da un graduale aggravamento che si è conclamato con il coinvolgimento dei muscoli respiratori. In nessuno dei due vi è stata l'evidenza di un'esposizione alla tossina botulinica, ma solo in uno dei due casi si è potuta escludere una forma di miastenia gravis con il test anticorpale specifico. In entrambi è stato inoltre riscontrata la presenza degli anticorpi antigangliosidici, di tipo GA1 nel primo, GM2 nel secondo, senza alcuna peculiarità rispetto agli altri soggetti sopravvissuti.

TERAPIA E DECORSO - La guarigione è avvenuta nella quasi totalità dei casi, anche in quelli non sottoposti ad alcuna terapia farmacologica, che hanno rappresentato la maggioranza della popolazione in oggetto. In medicina umana è contemplato l'uso di plasmaferesi ed immunoglobuline per ottenere una guarigione più rapida e recenti studi in medicina veterinaria (Hirschvogel K et al, 2012), hanno avvalorato tale ipotesi anche nel cane in cui, a fronte di un dato statistico non significativo, è stato però notato un miglioramento più rapido nei pazienti sottoposti a trattamento con immunoglobuline. A prescindere dalla gravità o meno della sintomatologia, sono state somministrate delle immunoglobuline per via endovenosa in 3 soggetti, secondo lo schema suggerito da alcuni autori (Kent, 2004, Cuddon, 2002). In tali casi non si è tuttavia assistito ad una più rapida guarigione, in comparazione con gli altri, ma l'esiguo numero dei soggetti trattati, non ha permesso una valutazione oggettiva dei dati. La limitazione per l'utilizzo di tale terapia è prettamente di natura economica, seppure vi sia anche una possibilità, benché bassa, di effetti collaterali, come ad esempio reazioni anafilattiche ed ematuria (Hirschvogel, 2012).

In 3 pazienti sono stati somministrati dai veterinari referenti degli antibiotici, che non trovano ragione terapeutica nei confronti dell' ACIP e pertanto, secondo un'opinione personale, non possono aver influenzato l'outcome dei pazienti. In nessun caso è stata somministrata una terapia corticosteroidica, in accordo con quanto suggerito dalla letteratura (Cuddon, 2002), ma si è impostato un trattamento fisioterapico in tutti i cani. Fatta eccezione per i 2 deceduti, la prognosi è stata favorevole nei restanti casi, dimostrando come effettivamente tale malattia abbia un'evoluzione autolimitante con risoluzione totale o parziale miglioramento spontaneo. La fisioterapia si è rivelata fondamentale per permettere il miglioramento del trofismo muscolare e aiutare il paziente nel recupero delle funzioni motorie (Cuddon, 2002; Olby, 2004).

In accordo con quanto riportato in letteratura, il 92% dei pazienti è migliorata/guarita in pochi mesi dalla diagnosi (Northington e Brown, 1982; Cuddon, 2002; de Lahunta e Glass, 2009).

7.2 ASPETTI DIAGNOSTICI

DETERMINAZIONE TITOLI ANTICORPALI DI AGENTI INFETTIVI - In accordo con un lavoro del 2011 (Holt, 2011) in cui la valutazione della sieroprevalenza di diversi agenti infettivi in cani con ACIP aveva evidenziato una maggiore rappresentazione di *Toxoplasma gondii*, anche nel presente studio si è riscontrata la presenza di IgG rivolte verso *Toxoplasma gondii* nel 27% della popolazione. Tale agente infettivo, alla stregua della neospora, è stato ipotizzato come possibile trigger piuttosto che agente casuale di malattia, in quanto i pazienti affetti sono migliorati e guariti in assenza di terapia specifica. Non è stata trovata alcuna correlazione significativa tra i pazienti con titolo anticorpale positivo per agenti infettivi e lo sviluppo di anticorpi antigangliosidi. Considerando in maniera più ampia la titolazione anticorpale, è interessante sottolineare come nel 40% dei casi si sia ottenuta una positività ad almeno un agente infettivo. Se invece ad essi vengono sommati anche gli altri potenziali fattori scatenanti, si arriva al riscontro di un possibile trigger nel 62% dei casi, il che potrebbe essere un dato molto interessante tenuto conto dell'ampia gamma di agenti patogeni non indagati. Infatti in medicina umana il *Campylobacter jejuni* assume un ruolo primario nello scatenare il “*molecular mimicry*” precedentemente descritto nel terzo capitolo di questa tesi (Ang, 2000; Bersudsky, 2000; Neisser, 2000). L'indagine elettiva per la diagnosi di campilobacteriosi, prevede l'isolamento da colture fecali fresche del *Campylobacter jejuni*. La natura di questo studio, che si presenta per la gran parte retrospettivo, ha reso purtroppo vana la possibilità di avere a disposizione tale campione biologico

portando addirittura ad una possibile sottostima dei possibili trigger nella presente popolazione.

INDAGINI ELETTRODIAGNOSTICHE – Il 77% dei pazienti è stato sottoposto ad indagini elettrodiagnostiche, che hanno evidenziato alterazioni patologiche sia a carico della muscolatura generalizzata (elettromiografia), che della componente nervosa (studi di conduzione nervosa).

Nella maggior parte dei casi tali esami sono stati eseguiti dopo circa una settimana dall'insorgenza della sintomatologia, e quindi in un momento ritenuto favorevole per il riscontro delle principali alterazioni elettrodiagnostiche. Nel presente lavoro è interessante iniziale notare come anche nei pazienti in cui tali indagini sono state eseguite dopo pochi giorni dall'insorgenza della sintomatologia (inferiore alla settimana) si siano in tutti i casi riscontrate sia delle alterazioni elettromiografiche, che di conduzione nervosa. In realtà anche in un precedente lavoro in cui venivano comparate le alterazioni elettrodiagnostiche nella specie canina e nella GBS, si segnalava la presenza di alterazioni anche nei casi di diagnostica eseguita precocemente (Cuddon, 1998). La nostra esperienza supporta pertanto la possibilità di un'esecuzione di tali test anche in tempi più rapidi rispetto a quelli comunemente indicati (Bernardini, 2010).

Le principali alterazioni elettrodiagnostiche che hanno supportato la diagnosi di ACIP sono state la presenza di attività muscolare spontanea generalizzata, una conduzione nervosa motoria diminuita (40%), una diminuzione dell'ampiezza dei CMAP (85%) e una latenza dell'onda F prolungata in tutti i casi, eccetto nei due pazienti che sono poi deceduti, dove l'onda F non è stata registrata.

L'ACIP si presenta di solito come una patologia che interessa prettamente la porzione motoria del sistema neuromuscolare (Cuddon, 2002). Tuttavia, da uno studio che ha valutato i reperti elettrodiagnostici in 12 cani con ACIP, da cui è emersa una

diminuzione dell'ampiezza del SNAP nel 36% dei cani esaminati, si è documentato un possibile coinvolgimento, seppure minimo, della porzione sensitiva nervosa, indipendentemente dalla sintomatologia clinica (Cuddon, 1998). Purtroppo a causa della grande variabilità delle ampiezze del SNAP anche in cani normali, l'autore ha ammesso una certa debolezza in tale interpretazione nel suo studio (Cuddon, 1998).

Nel presente lavoro, la SNAP è risultata diminuita nel 23% dei casi, mentre è stata rilevata un'ampiezza ridotta nel 14% dei soggetti. Questi risultati supporterebbero pertanto l'ipotesi riportata nello studio appena citato, seppure occorra cautela nell'interpretazione di questo dato, poiché l'ampiezza del SNAP è un parametro con un intervallo troppo grande che spesso assume scarsa utilità clinica.

L' aumento della latenza minima dell'onda F o la sua assenza è stata precedentemente correlata ad una sintomatologia clinica più grave (Cuddon, 1998). Nel nostro studio, tutti i cani hanno presentato un'alterazione dell'onda F, che è risultata addirittura assente nei due soggetti successivamente deceduti. Si potrebbe speculare che l'assenza di tale onda, può essere correlabile ad una prognosi peggiore, ma l'esiguità del numero dei soggetti, non ne permette una valutazione statistica oggettiva.

Come precedentemente proposto in uno studio (Cuddon, 1998) e successivamente suggerito da altri autori (Bianchi E, comunicazione personale), dal punto di vista elettrodiagnostico è possibile evidenziare oltre alla frequente forma demielinizzante comparabile con la **poliradiculoneuropatia demielinizzante infiammatoria acuta** dell'uomo (AIDP), anche una forma prevalentemente assonale, che mostra diverse similitudini con la **Neuropatia assonale motoria acuta** (AMAN), variante della GBS. Sulla base delle alterazioni elettrodiagnostiche, anche la popolazione presa in esame nella presente tesi, potrebbe essere distinta in due gruppi, di cui uno affetto da lesioni prevalentemente demielinizzanti (40%) e l'altra da lesioni prevalentemente assonali (60%). Sono tuttavia necessari ulteriori studi per poter avvalorare queste ipotesi, che potrebbero ulteriormente assimilare dal punto di vista clinico ed elettrodiagnostico l'ACIP e la GBS.

BIOPSIA MUSCOLARE E ESAME DEL LIQUIDO CEREBROSPINALE – Tra le indagini collaterali utilizzate per consolidare la diagnosi di ACIP, è descritta la biopsia muscolo-nervosa. Tale esame riveste un ruolo aspecifico, in virtù di un'inflammatione primaria che interessa le radici nervose, dove pertanto vengono rilevate le alterazioni più significative. La biopsia del nervo, avviene di solito a livello distale, dove le lesioni risultano aspecifiche caratterizzate da degenerazione assonale, che appaiono di scarsa utilità diagnostica. Solo su 4 cani si è proceduto alla biopsia muscolare e in due al prelievo di liquido cerebrospinale ottenendo dei reperti che tuttavia hanno consolidato la diagnosi. Il loro numero esiguo nel presente lavoro, può essere legato alle metodiche di invasività, non giustificate dal raggiungimento di un risultato specifico o patognomonico di ACIP. Tali indagini potrebbero essere declinate dai proprietari anche in considerazione di una celere ripresa o dell'aspettativa di una rapida guarigione del loro cane.

7.3 ANALISI ANTICORPI ANTI-GANGLIOSIDI GM2 E GA1

In un recente studio è stata dimostrata e documentata per la prima volta la presenza di anticorpi anti-gangliosidi in 25 cani affetti da ACIP (Rupp, 2013), raggiungendo una sensibilità del 60% e una specificità del 97% di tali anticorpi come biomarker per la diagnosi di ACIP. Il presente studio ha contribuito alla realizzazione di questo importante lavoro scientifico, fornendo l'84% dei campioni affetti da ACIP oggetto dell'analisi anticorpale (21 su 25) e i sieri di controllo dei 21 casi non affetti da patologie neurologiche.

Nel 65% della popolazione sono stati evidenziati gli anticorpi anti GM2 e GA1, con una netta predominanza dei primi sui secondi. Questo dato differisce profondamente dall'ampia varietà anticorpale che si evidenzia nella sindrome di Guillain Barré (Caudie et al, 2002; Kaida et al, 2007), ma supporta decisamente l'ipotesi che esista

una correlazione eziopatogetica tra l'ACIP e la GBS. Un altro aspetto interessante di tale sindrome è la tendenza all'associazione tra gli anticorpi anti-GM2 e le infezioni virali (come ad esempio il Cytomegalovirus) (Khalili-Shirazi et al., 1999), anche se sia stata dimostrata la produzione di tali anticorpi, anche in presenza di componenti lipopolisaccaridiche appartenenti al *Campylobacter jejuni* (Ritter et al., 1996; Ang et al., 2002).

Riprendendo i dati del nostro lavoro, sulla base di una sintomatologia gastroenterica, la presenza del *Campylobacter* poteva essere ipotizzata nei quattro cani in cui si riferiva la presenza di una sintomatologia gastroenterica nelle due settimane antecedenti l'esordio della poliradicoloneurite. In realtà non sempre è stata trovata un'associazione significativa tra il *Campylobacter* e la presenza di feci diarroiche (Wieland et al., 2005; Parsons et al., 2010), pertanto non si esclude che anche i cani positivi per anticorpi anti-GM2, ma senza in anamnesi la presenza di una sintomatologia gastroenterica, possano in realtà aver avuto un contatto con tale microrganismo.

La metodica scelta per la ricerca di Anticorpi Anti Gangliosidici è stata quella con matrice glucidica, o glicarray. In due recenti lavori essa si è dimostrata maggiormente sensibile rispetto alla tecnica ELISA (Rupp et al., 2013; Galban-Horcajo et al., 2013) evidenziando una sensibilità rispettivamente del 60% a fronte del 40% ottenuto con la tecnica ELISA (Rupp et al., 2013). Con la stessa tecnica, nel gruppo di controllo è stato individuato un titolo anticorpale positivo per GM2 solo in un paziente, confermando l'elevata specificità del test (97%) come precedentemente riportato in letteratura (Rupp et al., 2013). Tale positività in un paziente non malato, potrebbe essere spiegata con il fatto che anche nella popolazione umana non affetta dalla sindrome di Guillain-Barrè è possibile osservare il rilievo di anticorpi anti-GM2 in una minima percentuale di casi (Khalili-Shirazi et al., 1999) oppure con la possibilità che il cane in questione, potesse essere reduce da una pregressa poliradicoloneurite in forma lieve, pertanto quasi paucisintomatica, con persistenza del

titolo anticorpale, che ad esempio nell'uomo può perdurare fino a 6 mesi (Odaka et al., 2003).

Non è stata riscontrata una variazione della prognosi nel gruppo dei soggetti con titolo anticorpale positivo per anti-GM1 e GA1, anche in considerazione del tipo di anticorpo presente. La loro presenza non è esitata in una prognosi peggiore nei pazienti in cui è stato riscontrato un potenziale trigger o un titolo anticorpale contro gli agenti infettivi testati.

All'interno della popolazione la presenza degli anticorpi anti-gangliosidi è apparsa distribuita in maniera uniforme, senza alcuna predilezione nelle classi in cui vi poteva essere una stimolazione del sistema immunitario, come poteva avvenire nei cani risultati positivi all'indagine anticorpale diretta contro gli agenti infettivi o quelli che avevano presentato una precedente esposizione ad un fattore scatenante una possibile reazione immunitaria aberrante.

7.4 CONCLUSIONI

Il presente lavoro si è posto come primo obiettivo, quello di descrivere le caratteristiche cliniche di 26 cani affetti da poliradicoloneurite acuta idiopatica, non trovando particolari differenze relative al segnalamento e all'anamnesi rispetto alla letteratura. L'esame neurologico ha evidenziato una sintomatologia più lieve o focale in alcuni soggetti, evenienza solo sporadicamente descritta in bibliografia.

Diversi risultati permetterebbero di consolidare l'ipotesi di una notevole similitudine tra la GBS e l'ACIP, tra cui il riscontro di potenziali trigger, unitamente all'identificazione di specifici agenti infettivi e i risultati delle indagini elettrodiagnostiche. Tuttavia, il dato principale, in grado di assimilare tali patologie dal punto di vista patogenetico, è stato il riscontro di anticorpi anti gangliosidici, che sono stati rilevati nel 65% dei casi. La possibilità di utilizzare questi anticorpi anti-gangliosidi come biomarker, permetterà di incrementare le potenzialità diagnostiche per l'ACIP, andando ad integrare o addirittura sostituire quelle procedure più invasive

o che necessitino dell'anestesia generale per la loro esecuzione, come l'indagine elettrodiagnostica e la biopsia muscolo-nervosa.

BIBLIOGRAFIA

Ang CW, Endtz HP, Jacobs BC, Laman JD, de Klerk MA, van der Meché FG, van Doorn PA, Campylobacter jejuni lipopolysaccharides from Guillain-Barré syndrome patients induce IgG anti-GM1 antibodies in rabbits. *J Neuroimmunol.* May 1;104(2):133-8, 2000.

Ang CW, Noordzij PG, de Klerk MA, Endtz HP, van Doorn PA, Laman JD, Ganglioside mimicry of Campylobacter jejuni lipopolysaccharides determines antiganglioside specificity in rabbits. *Infect Immun* 70:5081–5085 2002.

Arnason BGW, Soliven B: Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. In Dyck PJ, Thomas PK (eds): *Peripheral neuropathy*, ed 3. Philadelphia, WB Saunders, pp1437-1497, 2000.

Bagley R. Options for diagnostic testing in animals with neurologic disease. In: *Foundamentals of Veterinary Clinical Neurology*. Ed.Blackwell (2005) pag.222; 224

Barone R, Simoens P, *Anatomia Comparata dei Mammiferi Domestici*, Vol.7/2, Ed Edagricole, p 8, 2012.

Bernardini M, *Neuroanatomia, Neurologia del cane e del gatto* 2 ed., Poletto Ed., p2, 2010

Bernardini M, Poliradicoloneurite acuta idiopatica, in *Malattie idiopatiche, Neurologia del cane e del gatto* 2 ed., Poletto Ed., p250, 2010.

Bersudsky M, Rosenberg P, Rudensky B, Wirguin I, Lipopolysaccharides of a *Campylobacter coli* isolate from a patient with Guillain-Barré syndrome display ganglioside mimicry. *Neuromuscul Disord*. Mar;10(3):182-6, 2000.

Blackmore JA, Schaer M, Idiopathic polyradiculoneuritis and impaired ventilation in a dog: a case report. *J Am Anim Hosp Assoc*; 20:487-490, 1984.

Braund KG, Neurological Syndromes, Neuropathic Disorders, In: Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment, (Ed.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003.

Braund KG, Luttgen PJ, Sorjonen DC, Redding RW, Idiopathic facial paralysis in the dog. *Veterinary Record* 105, 297-299, 1979

Charteris H, Rare condition in a rottweiler. *Vet Rec* 123:679, 1988.

Chetboul V, Cas clinique: Polyradiculonevrite post-vaccinale. *Le Pointe Veterinaire* 21:83–85, 1989

Caudie C, Vial C, Bancel J, Petiot P, Antoine JC, Gonnaud PM. Antiganglioside autoantibody profiles in Guillain-Barre syndrome. *Ann Biol Clin*, 60:589–597, 2002.

Cuddon PA. Electrophysiologic assessment of acute polyradiculoneuropathy in dogs: comparison with Guillain-Barre syndrome in people. *J Vet Intern Med* 12:294–303, 1998.

Cuddon PA, Acquired canine peripheral neuropathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 32:207–249, 2002.

Cummings JF, Haas DC, Coonhound paralysis. An acute idiopathic polyradiculoneuritis in dogs resembling the Landry-Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Sci* 4:51–81, 1967.

Cummings JF, Haas DC, Animal model for human disease: idiopathic polyneuritis, Guillain-Barre syndrome. Animal model: coonhound paralysis, idiopathic polyradiculoneuritis of coonhounds. *Am J Pathol* 66:189–192, 1972.

Cummings JF, de Lahunta A, Holmes DF, Schultz RD. Coonhound paralysis. Further clinical studies and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* 56:167–178, 1982.

de Galan BE, van Kasteren BJ, van den Wall Bake AWL, Vreugdenhil G, A Case of Guillain-Barré Syndrome due to Infection with *Rickettsia conorii*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Volume 18, p79-80, 1999

de Lahunta A, Glass E. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Saunders, Elsevier, St. Louis, p 2 e 78-91, 2009

Di Terlizzi R., Platt S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part II- Analysis. *The Veterinary Journal* 180:15-32, 2009.

Dornonville de la Cour C, Jakobsen J, Residual neuropathy in long-term population-based follow-up of Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 64 (2): 246–53, 2005.

Duncan ID, Peripheral nerve disease in the dog and cat. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 10:177-211, 1980.

Feasby TE, Gilbert JJ, Brown WF, Bolton CF, Hahn AF, Koopman WF, Zochodne, DW, An acute axonal form of Guillain–Barre´ polyneuropathy. *Brain* 109, 1115–1126, 1986.

Fisher M, Syndrome of ophthalmoplegia, ataxia and areflexia. *New Engl. J. Med.* 255, 57–65, 1956.

Galban-Horcajo F, Fitzpatrick AM, Hutton AJ, Dunn SM, Kalna G, Brennan KM, Rinaldi S, Yu RK, Goodyear CS, Willison HJ, Antibodies to heteromeric glycolipid complexed in multifocal motor neuropathy. *Eur J Neurol* 20:62–70, 2013.

Gehring R, Eggars B: suspected post-vaccinal acute polyradiculoneuritis in a puppy. *J S Afr Vet Assoc* 72:96, 2001.

Gilbert SC, Bell’s palsy and herpesviruses. *Herpes* 9, 70-73, 2002

Glass EN, Kent M, The clinical examination for neuromuscular disease, *Vet Clin N Am*, Jan 32:1, pp1-31, 2002.

Greene CE, Protozoal diseases, in: *Infectious disease of dogs and cats*, 4th ed., ED Saunders, p742, 2011.

Harve RS, Acute idiopathic polyradiculoneuritis in a dog (a case report and discussion). *Vet Med Small Anim Clin* 74:675-679, 1979.

High ME. Acute canine polyradiculoneuritis. *Can Vet J* 37:305, 1996.

Hirschvogel K, Jurina K, Steinberg T, Matiasek L, Matiasek K, Beltran E, Fischer A. Clinical course of acute canine polyradiculoneuritis following treatment with human IV immunoglobulin. *J Am Anim Hosp Assoc* 48:1–11, 2012.

Holmes DF, Schultz RD, Cummings JF et al, Experimental Coonhound paralysis: animal model of Guillain Barrè syndrome. *Neurology* 29, 1.186, 1979.

Holt N, Murray M, Cuddon PA, Lappin MR, Seroprevalence of Various Infectious Agents in Dogs with Suspected Acute Canine Polyradiculoneuritis, *J Vet Intern Med*;25:261–266, 2011.

Hughes RA, Cornblath DR (2005). Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 366:1653–1666.

Hughes RA, Hadden RDM, Gregson NA, Smith KJ, Pathogenesis of Guillain–Barre´ syndrome, *Journal of Neuroimmunology* 100, 74–97, 1999.

Iwasaki Y e Kinoshita M, Idiopathic Multiple Cranial Neuropathy, A Twenty Year Experience *Jpn J Med* Vol 28, N° 3 May-June, 1989.

Jacobs BC, Rothbarth PH, Van der Meche FG, Herbrink P, Schmitz PIM, de Klerk MA, van Doorn PA. The spectrum of antecedent infections in Guillain–Barre´ syndrome: a case control study. *Neurology* 51, 1110–1115, 1998.

Kaida K, Morita D, Kanzaki M, Kamakura K, Motoyoshi K, Hirakawa M, Kusunoki S. Anti-ganglioside complex antibodies associated with severe disability in GBS. *J Neuroimmunol* 182:212–218, 2007.

King AS, *Physiological and clinical anatomy of the domestic mammals, Vo.1 Central Nervous, System*, Ed Blackwell, p65, 1987.

Kent M, Therapeutic options for neuromuscular diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Nov;34(6):1525-51, 2004

Kern TJ, Erb HN, Facial neuropathy in dogs and cats: 95 cases (1975-1985). *J Am Vet Med Ass* 191, 1604-1609, 1987

Khalili-Shirazi A, Gregson N, Gray I, Rees J, Winer J, Hughes R, Antiganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome after a recent cytomegalovirus infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:376–379, 1999.

Knox, GW, Treatment controversies in Bell's palsy. *Archives of Otolaryngology – Head & Neck Surgery* 124, 821-823, 1998.

Koga M, Kusunoki S, Kaida K, Uehara R, Nakamura Y, Kohriyama T, Kanda T, Nationwide survey of patients in Japan with Bickerstaff brainstem encephalitis: epidemiological and clinical characteristics. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*, 2012.

Low PA, Dyck PJ, Lambert EH, Brimijoin WS, Trautmann JC, Malagelada JR, Fealey RD, Barrett DM, Acute panautonomic neuropathy. *Ann. Neurol.* 13 (4): 412–7, 1983.

McKhann GM, Cornblath DR, Ho T, Li CY, Bai AY, Wu HS, Yei QF, Zhang WC, Zhaori Z, Jiang Z. Clinical and electrophysiological aspects of acute paralytic disease of children and young adults in northern China. *Lancet* 338:593–597, 1991.

McGonigal R, Rowan EG, Greenshields KN, Halstead SK, Humphreys PD, Rother RP, Furukawa K, Willison HJ. Anti-GD1a antibodies activate complement and calpain to injure distal motor nodes of Ranvier in mice. *Brain* 133:1944–1960, 2010..

Molín J, Márquez M, Raurell X, Matiasek K, Ferrer I, Pumarola M, Acute clinical onset chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in a dog. *Muscle Nerve*. 2011 Sep;44(3):441-4.

Motta L, Michal Altay U, Skerritt GC, Bell's palsy with concomitant idiopathic cranial nerve polyneuropathy in seven dogs, *Journal of Small Animal Practice*, Vol 52, July, 2011.

Munsat TL and Barnes JE: Relation of multiple cranial nerve dysfunction to the Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 28: 115, 1965.

Neisser A, Schwerer B, Bernheimer H, Moran AP, Ganglioside-induced antiganglioside antibodies from a neuropathy patient cross-react with lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré syndrome. *J Neuroimmunol*, Jan 3;102(1):85-8, 2010.

Northington JW, Brown MJ, Farnbach GC et al, Acute idiopathic polyneuropathy in the dog, *JAVMA* 179:374-379, 1981.

Northington JW, Brown MJ, Acute canine idiopathic polyneuropathy. A Guillain-Barre-like syndrome in dogs. *J Neurol Sci* 56:259–273, 1982.

Odaka M, Koga M, Yuki N, Susuki K, Hirata K. Longitudinal changes of anti-ganglioside antibodies before and after Guillain-Barre syndrome onset subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *J Neurol Sci* 210:99–103, 2003.

O'Hanlon GM, Plomp JJ, Chakrabarti M, Morrison I, Wagner ER, Goodyear CS, Yin X, Trapp BD, Conner J, Molenaar PC, Stewart S, Rowan EG, Willison HJ, Anti-GQ1b ganglioside antibodies mediate complement-dependent destruction of the motor nerve terminal. *Brain* 124:893–906, 2001.

Olby NJ, Tetraparesis. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology. Platt SR, Olby NJ (Eds). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, pp 214–236, 2004.

Oliveira TM, Furuta PI, de Carvalho D, Machado RZ, A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. *Rev Bras Parasitol Vet*, Jan-Mar;17(1):7-11, 2008.

Orlikowski D, Guillain–Barré Syndrome following Primary Cytomegalovirus Infection: A Prospective Cohort Study. *Clin Infect Dis*. 52 (7): 837–844, 2011.

Parsons BN, Porter CJ, Ryvar R, Stavisky J, Williams NJ, Pinchbeck GL, Birtles RJ, Christley RM, German AJ, Radford AD, Hart CA, Gaskell RM, Dawson S, Prevalence of *Campylobacter* spp. in a cross-sectional study of dogs attending veterinary practices in the UK and risk indicators associated with shedding. *Vet J* 184:66–70, 2010.

Parzefall B, Fischer A, Blutke A, Schmahl W, Matiasek K, Naturally occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs. *Vet J* Jul;189(1):100-2, 2011.

Platt S.R., Olby N.J.. Patologia clinica. In: Neurologia clinica del cane e del gatto. Ed. UTET pag 47-48; 50-51, 2007.

Ritter G, Fortunato SR, Cohen L, Noguchi Y, Bernard EM, Stockert E, Old LJ, Induction of antibodies reactive with GM2 ganglioside after immunization with lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni*. *Int J Cancer* 66:184–190, 1996.

Rupp A, Morrison I, Barrie JA, Halstead SK, Townson KH, Greenshields KN, Willison HJ, Motor nerve terminal destruction and regeneration following anti-

ganglioside antibody and complement-mediated injury: an in and ex vivo imaging study in the mouse. *Exp Neurol* 233:836–848, 2012.

Rupp A, Galban-Horcajo F, Bianchi E, Dondi M, Penderis J, Cappell J, Burgess K, Matiasek K, McGonigal R, Willison HJ, Anti-GM2 ganglioside antibodies are a biomarker for acute canine polyradiculoneuritis. *Journal of the Peripheral Nervous System* 18:75–88, 2013.

Rutter CR, Rozanski EA, Sharp CR, Powell LL, Kent M, Outcome and medical management in dogs with lower motor neuron disease undergoing mechanical ventilation: 14 cases (2003-2009). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*, 2011.

Sivadon-Tardy V, Orlikowski D, Porcher R, Sharshar T, Durand MC, Enouf V, Rozenberg F, Caudie C, Annane D, van der Werf S, Lebon P, Raphaël JC, Gaillard JL, Gault E, Guillain-Barré syndrome and influenza virus infection. *Clinical Infectious Diseases* 48 (1): 48–56, 2009.

Tellería-Díaz A, Calzada-Sierra DJ, Guillain Barre syndrome, *Rev Neurol* 34 (10): 966–76, 2002.

Vandevelde M, Oettli P, Fatzner L et al, Polyradiculoneuritis beim Hund. Klinische histologische und ultrastrukturelle Beobachtungen. *Scweitz Arch Tierheilkd* 123: 207, 1981.

van Doorn PA, Ruts L, Jacobs BC. Clinical features, pathogenesis, and treatment of Guillain-Barre syndrome. *Lancet Neurol* 7:939–950, 2008.

Vite CH, Idiopathic Polyradiculoneuritis, Neuropathic Disorders, In: Braund's Clinical Neurology in Small Animals: Localization, Diagnosis and Treatment, (Ed.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2003.

Vucic S, Kiernan MC, Cornblath DR. Guillain-Barre syndrome: an update. *J Clin Neurosci* 16:733–741, 2009.

Wieland B, Regula G, Danuser J, Wittwer M, Burnens AP, Staerk KDC. *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. *J Vet Med B* 52:183–189, 2005.

Willison HJ. The immunobiology of Guillain-Barre syndromes. *J Peripher Nerv Syst* 10:94–112, 2005.

Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and antiglycolipid antibodies. *Brain* 125:2591–2625, 2002.

Winer JB. Guillain Barre syndrome. *Mol Pathol* 54:381–385, 2001.

Yu RK, Usuki S, Ariga T, Ganglioside molecular mimicry and its pathological roles in Guillain-Barre syndrome and related diseases. *Infect Immun* 74:6517–6527, 2006.

Yuki N, Hartung HP, Guillain-Barre´ syndrome. *N Engl J Med* 366:2294–2304, 2012.

Yuki N, *Campylobacter* genes responsible for the development and determinant of clinical features of Guillain-Barré syndrome, *Nippon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 66 (6): 1205–10, 2008.