

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in SALUTE ANIMALE

Ciclo XXIII

**PREVALENZA DELLE ALTERAZIONI NEUROLOGICHE INDOTTE DAL
VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA (FIV) E DAL VIRUS DELLA
LEUCEMIA FELINA (FeLV) NELLA POPOLAZIONE FELINA LIBERA E DI
COLONIA DEL TERRITORIO COMUNALE DI PARMA**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Cavirani Sandro

Tutor:
Chiar.mo Prof. Martelli Paolo

Dottorando: Dott.ssa Ravera Manuela

INDICE

ABSTRACT.....	pag. 3
INTRODUZIONE.....	pag 4
CAPITOLO 1: SISTEMA NERVOSO PERIFERICO.....	pag 5
CAPITOLO 2: RETROVIRUS FELINI.....	pag 9
CAPITOLO 3: ELETTRODIAGNOSTICA:TEST UTILIZZATI.....	pag 23
CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI.....	pag 34
CAPITOLO 5: RISULTATI.....	pag 37
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE e CONCLUSIONI.....	pag 42
BIBLIOGRAFIA.....	pag 45

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) and Feline Leukaemia virus (FeLV) are both retroviruses characterised by global impact on the health of domestic cats. The two viruses differ in their potential capacity to cause disease, but neurological signs have been described in both infections.

The aims of this study were: 1) to obtain information about epidemiological situation of FIV and FeLV in the district of Parma and 2) to analyze motor and sensory pathways through some electrodiagnostic tests performed on a group of infected cats.

Feline serum samples from 95 cats were tested for antibodies to FIV and for antigen of FeLV by enzyme-linked immunosorbent assay. Electrodiagnostic tests consisted in the analysis of Peripheral Nerve Motor Conduction, Peripheral Sensory Nerve Conduction, F-waves and Cord Dorsum Potential.

The prevalence of FIV infection in the population considered in this study was 15,8%. A major percentage was recorded in males. The prevalence of FeLV infection was 9,5% and no gender differences were observed.

Electrodiagnostic studies showed a reduction in motor nerve conduction velocity, a decrease in CMAP amplitude and a reduction in F waves amplitude and velocity. Abnormal findings at peripheral nervous system are characterized by both demyelinating and axonal damage.

INTRODUZIONE

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) e il Virus della Leucemia Felina (FeLV) sono retrovirus che colpiscono in modo specifico i felini causando un'ampia varietà di quadri morbosi dovuti sia all'azione patogena diretta dei virus che alla depressione delle difese immunitarie indotta dai virus stessi. Le alterazioni cliniche più frequenti sono anemie, linfomi, infiammazioni croniche ed infezioni secondarie. Tra gli organi bersaglio di questi virus vi è anche il sistema nervoso. Questo può essere interessato da alterazioni infiammatorie (encefaliti, polineuriti, etc.), degenerative (mielopatia degenerativa FeLV indotta, etc.) e neoplastiche (linfoma, etc.).

E' opportuno sottolineare che, in seguito allo stato di immuno-depressione, i soggetti infettati da FIV e FeLV sono spesso colpiti anche da altri patogeni e quindi possono rappresentare un serbatoio per numerosi agenti infettivi, alcuni dei quali responsabili di zoonosi. Il controllo della diffusione di questi virus è quindi importante per il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie delle aree occupate dalle colonie.

In letteratura è ampiamente documentato il coinvolgimento del Sistema Nervoso Centrale in corso di infezione da questi virus, FIV in particolare è stato impiegato come modello di studio per comprendere meglio i meccanismi patogenetici attraverso il quale il virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV) causa encefalo-mielite. Ad oggi, invece, le alterazioni a carico del Sistema Nervoso Periferico del gatto ad opera di questi virus sono state ancora poco indagate.

Obiettivo di questo studio è quello di analizzare, nel dettaglio, le vie motorie e sensitive periferiche mediante l'impiego di alcuni test elettrodiagnostici specifici nei soggetti FIV positivi e FeLV positivi. I dati funzionali oggettivi così ottenuti saranno comparati con quelli relativi ai soggetti normali.

Questa valutazione permetterà quindi di determinare la sede e il tipo di alterazioni funzionali, cliniche e subcliniche, presenti a carico del sistema nervoso periferico nei soggetti positivi per FIV e/o FeLV.

Un ulteriore obiettivo di questo studio, strettamente legato al primo, sarà di stabilire la prevalenza dell'infezione FIV e FeLV nelle popolazioni feline del territorio di Parma mediante l'impiego di test rapidi ad elevata sensibilità e specificità.

CAPITOLO 1

ANATOMIA E FISIOLOGIA DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO

Il Sistema Nervoso Periferico è costituito dai nervi cranici, dai nervi spinali e dai gangli loro annessi. Il Sistema Nervoso periferico, mediante neuroni afferenti (neuroni sensitivi), raccoglie informazioni che trasporta al Sistema Nervo Centrale e da questo, mediante neuroni efferenti (neuroni motori), partono le risposte agli organi effettori (via finale comune).

I nervi che contengono fibre sensitive e motorie vengono detti misti.¹

I nervi cranici sono in numero di 12 paia e si susseguono in senso rostro-caudale. Tranne il primo, tutti prendono origine dal tronco cerebrale; dopo un tragitto più o meno lungo dal punto di origine, escono dalla cavità cranica e proseguono con un percorso extracranico per distribuirsi alla periferia. Sono sensitivi i nervi olfattivo, ottico e vestibolare; gli altri sono misti.¹

I nervi cranici sono: Nervi Olfattivi, Nervo Ottico, Nervo Oculomotore, Nervo Trocleare, Nervo Trigemino, Nervo Abducente, Nervo Facciale, Nervo Vestibolococleare, Nervo Glossofaringeo, Nervo Vago, Nervo Accessorio, Nervo Ipoglosso.¹

Non ci dilungheremo sull'anatomia dei nervi cranici non essendo oggetto del nostro studio.

I nervi spinali ordinati in paia, sono simmetricamente disposti su ciascun lato del midollo spinale al quale sono attaccati mediante radicole. Ad eccezione del tratto cervicale dove vi sono costantemente otto nervi, il loro numero, negli altri tratti del midollo spinale, è variabile a seconda della specie. I nervi spinali vengono classificati a seconda della loro origine e destinazione in cervicali, toracici, lombari, sacrali e coccigei. Nel gatto abbiamo 8 cervicali, 13 toracici, 7 lombari, 3 sacrali e 5-6 coccigei.¹

Ogni nervo è indicato con il numero della vertebra caudalmente alla quale esce dal canale vertebrale. Questa regola, però, non si verifica nella regione cervicale le cui sette vertebre sono associate a otto nervi ed il primo paio di nervi cervicali passa attraverso i fori vertebrali laterali dell'atlante e il secondo paio tra quest'ultimo e l'epistrofeo, di conseguenza l'ottavo nervo esce dopo la settima vertebra cervicale.¹

Ogni nervo è connesso al midollo spinale mediante due radici, una dorsale, più grossa, o radice sensitiva, formata da fibre afferenti, ed una ventrale, più esile, o radice motoria costituita da fibre efferenti. Ciascuna radice è legata al midollo spinale tramite sottili filamenti o radicole; le radicole ventrali originano dalla superficie ventro-laterale del midollo, mentre quelle dorsali penetrano a livello del solco dorso-laterale. In particolare, le radicole dorsali sono formate dai prolungamenti centrali delle cellule pseudounipolari situate nel ganglio corrispondente.¹

La radice ventrale si unisce ai prolungamenti periferici delle cellule del ganglio spinale costituendo il nervo spinale propriamente detto. A livello dei nervi toracici e lombari la radice ventrale contiene anche fibre pre-gangliari dei neuroni del nucleo intermedio laterale, appartenenti al sistema nervoso autonomo.¹

Il nervo spinale propriamente detto è misto in quanto contiene quattro componenti funzionali: afferente somatica generale (ASG), afferente viscerale generale (AVG), efferente somatica generale (ESG) e efferente viscerale generale (EVG).¹

Il nervo spinale, dopo aver attraversato il foro intervertebrale, si divide in due branche, una dorsale e una ventrale. Le brache dorsali sono sottili e si distribuiscono alla regione epiaissiale mediante rami muscolari e cutanei. Le branche ventrali, ad eccezione dei primi due nervi cervicali, sono più robuste delle dorsali; a livello dei nervi toracici decorrono isolate negli spazi intercostali, mentre quelle appartenenti agli altri tratti spinali si anastomizzano e si scambiano fibre formando dei plessi: il plesso cervicale, il plesso brachiale e il plesso lombo-sacrale.¹

I nervi cervicali sono in numero di 8 paia in tutti i mammiferi. La branca dorsale fornisce rami per la cute e i muscoli della regione dorsale del collo, inoltre le brache dorsali dei nervi III-IV formano il plesso cervicale dorsale. La branca ventrale dei nervi cervicali è destinata all'innervazione dei muscoli ventrali del collo e della cute della stessa regione, le brache ventrali dei nervi IV e V si uniscono a formare il plesso cervicale ventrale. Infine le brache ventrali degli ultimi quattro nervi cervicali partecipano alla formazione del nervo frenico e del plesso brachiale, in particolare nel gatto: per il nervo frenico sono C4-C5-C6, per il plesso brachiale sono C6-C7-C8-T1-T2.¹

Il plesso brachiale si trova circa a livello dell'articolazione scapolo-omerale e i nervi che ne derivano sono prevalentemente destinati all'arto toracico, solo alcuni si distribuiscono alla regione della spalla. Le diramazioni nervose principali sono: nervo succlavio, nervo soprascapolare, nervo sottoscapolare, nervo muscolo-cutaneo, nervo ascellare, nervi pettorali craniali, nervo toracico lungo, nervo toracodorsale, nervo toracico laterale, nervi pettorali caudali, nervo radiale, nervo mediano e nervo ulnare.¹

I nervi toracici, come già detto, escono dal canale vertebrale caudalmente alla vertebra corrispondente di numero e si dividono in una branca dorsale e una ventrale. In particolare la branca ventrale, più spesso di quella dorsale, è unita al tronco simpatico mediante rami comunicanti e costituisce il nervo intercostale.¹

I nervi lombari sono in numero uguale alle corrispondenti coste; l'ultimo nervo passa attraverso il foro intervertebrale lombo-sacrale. Le branche ventrali, unite al tronco simpatico, formano insieme alle brache ventrali dei nervi sacrali il plesso lombo-sacrale.¹

In particolare, il plesso lombare è situato centralmente ai processi trasversi lombari. I nervi che derivano dal plesso lombare sono destinati alla parete addominale, agli organi genitali, alle mammelle inguinali e a parti dell'arto pelvico: nervo ileo-ipogastrico; nervo ileo-inguinale; nervo genitofemorale; nervo cutaneo femorale laterale; nervo femorale, che uscito dalla cavità addominale fornisce il nervo safeno; nervo otturatore.¹

I nervi sacrali, in numero uguale alle vertebre omonime, si staccano dal midollo spinale caudalmente all'intumescenza lombare e concorrono a formare la cauda equina. Le branche ventrali formano il plesso sacrale.¹

Il plesso sacrale è situato nella cavità pelvica, ventralmente al sacro, contro la parete laterale del bacino. Abbiamo: il nervo gluteo craniale, il nervo gluteo caudale; nervo cutaneo femorale caudale; nervo ischiatico, che termina dividendosi nel nervo peroneo comune e nel nervo tibiale; nervo pudendo; nervi rettali caudali.¹

Le fibre nervose conducono gli impulsi dalla periferia sensoriale ai centri e dai centri agli organi effettori periferici. Alla porzione periferica del sistema nervoso compete la funzione di conduzione degli impulsi, che è centripeta nelle fibre afferenti o sensitive, centrifuga nelle fibre efferenti o motrici.²

Il potenziale d'azione o impulso nervoso dell'assone consiste in una depolarizzazione seguita da un'inversione del potenziale transmembranario ed infine una ripolarizzazione che riporta le condizioni elettriche della membrana a quelle di partenza.²

Stimolando l'assone con metodo bipolare una parte della corrente fluisce all'esterno e una parte della corrente penetra attraverso la membrana in corrispondenza dell'anodo e fuoriesce a livello del catodo, dopo aver percorso l'interno della fibra. La densità della corrente è massima a livello di anodo e catodo. La corrente che fluisce verso l'esterno in direzione del catodo causa una depolarizzazione della membrana. In corrispondenza dell'anodo invece si riscontra un certo grado di iperpolarizzazione. Quando l'iperpolarizzazione è tale da ridurre il potenziale transmembranario di circa 20 mV si raggiunge il potenziale soglia e ha luogo il potenziale d'azione.²

Il potenziale d'azione dura circa 1 ms. Durante questo periodo la fibra nervosa è ineccitabile, qualunque sia l'intensità di stimolo (periodo refrattario assoluto). A questo periodo segue il periodo refrattario relativo, in cui la fibra è eccitabile con stimoli di intensità superiore al valore soglia.²

I neuroni entrano in contatto funzionale con altri neuroni mediante giunzioni chiamate sinapsi: le placche neuromuscolari sono le sinapsi più estese nell'organismo dei vertebrati. La trasmissione del segnale è unidirezionale dal nervo al muscolo e l'informazione è di tipo eccitatorio.²

In prossimità della fibra muscolare ogni terminale assonico perde la guaina mielinica e si ramifica in brevi prolungamenti, ognuno di questi prolungamenti contiene molti mitocondri e una gran

numero di vescicole , all'interno delle quali è impacchettato il neurotrasmettitore. La placca motrice è ricoperta, all'esterno, da un sottile strato di cellule di Schwann, e sul versante interno è separata dalla membrana della fibra muscolare da una fessura di circa 50 nm.²

La membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare è caratterizzata da una struttura ampiamente ripiegata e da una elevata concentrazione di grosse molecole proteiche. Subito dopo il contatto tra neurone e fibra muscolare i recettori si addensano a livello della giunzione formando una matrice di recettori strettamente impacchettati.²

Sono quattro gli eventi fondamentali della placca neuromuscolare: la sintesi di Acetilcolina (ACh), il rilascio dal neurone presinaptico, il legame con il recettore e la conseguente modificazione del potenziale postsinaptico; la distruzione enzimatica dell'ACh.²

L'ACh viene sintetizzata nel citosol a partire da acetilcoenzima A e colina, grazie alla presenza dell'enzima colinaacetiltransferasi. L'ACh, così fabbricata, viene impacchettata all'interno delle vescicole presinaptiche. La depolarizzazione, provocata dall'arrivo del potenziale d'azione, provoca l'apertura dei canali del Ca^{2+} e il conseguente influsso di Ca^{2+} che consente la fusione delle vescicole con la membrana e, quindi, la fuoriuscita del mediatore chimico. In risposta al mediatore rilasciato dall'attività nervosa, i recettori della placca motrice provocano la depolarizzazione dell'area della placca o potenziale di placca. In condizioni fisiologiche questo potenziale è sufficientemente ampio da generare nella fibra muscolare un potenziale d'azione propagato e una contrazione.²

Le molecole di ACh formano con i recettori dei legami di brevissima durata. Dopo aver reagito una sola volta con i recettori, vengono rapidamente inattivate ad opera di un enzima extracellulare, l'acetilcolinesterasi, che provoca l'idrolisi ad acetato e colina.²

CAPITOLO 2

RETROVIRUS FELINI: FIV E FeLV

VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA (FIV)

MORFOLOGIA

Il virus dell'Immunodeficienza Felina è un retrovirus a RNA appartenente al genere Lentivirus; in letteratura è associato strettamente al virus dell'Immunodeficienza Umana a causa delle forti similitudini nella struttura, nel ciclo vitale e nella patogenesi.

E' importante sottolineare che l'uomo non è suscettibile all'infezione da FIV; però è stata isolata una certa varietà di Virus dell'Immunodeficienza Felina specie-specifici da diversi felidi non-domestici, quali puma, leoni e leopardi.³

I lentivirus sono retrovirus complessi, contenenti geni accessori oltre al gag, al pol e all'env. Il gene gag codifica per la proteina di capsid p24, molto importante per la diagnosi di malattia. Invece il gene pol codifica per proteasi, integrasi e transcriptasi inversa oltre che per enzimi addizionali importanti per la virulenza. Il gene env codifica per la glicoproteina virale gp120 e per la proteina transmembrana gp41, i maggiori determinanti di diversità virale tra quelli isolati.³

Sono stati individuati cinque (dalla A alla E) sottotipi geneticamente distinti, con una considerevole varietà di sequenze nel gene env. La maggior parte dei virus identificati fino ad ora appartengono alla classe A o B. Nel Regno Unito è stato isolato solo lo stipite A. In altri Paesi come Svizzera, Germania, Australia e Stati Uniti occidentali, sebbene lo stipite A sia il predominante, coesistono altri subtipi. I virus sottotipo B sono distribuiti soprattutto nel mondo dei selvatici, ma sono stati isolati anche in quantità considerevole in Italia, Portogallo e Stati Uniti orientali. Infine il sottotipo C è meno comune, tutti i virus sottotipo D provenivano dal Giappone e due ceppi isolati in Argentina sono stati assegnati al sottotipo E.³

Il virus è molto labile e sopravvive alcuni minuti fuori dall'ospite ed è sensibile alla maggior parte dei comuni disinfettanti.³

EPIDEMIOLOGIA E TRASMISSIONE

Il FIV è un comune virus ubiquitario e la sua incidenza varia a seconda dell'area geografica.⁴

Uno studio del 1992 in 277 gatti malati stanziati in Italia ha pubblicato un 24% di positività a FIV⁵; un altro studio del 1994 in 432 gatti del nord Italia con diverse condizioni di vita ha documentato una percentuale del 12,6 % di positività, di questi 74,5% erano maschi e 25,5% femmine⁶; ancora, in uno studio del 2002 si parla di 14,1% in 349 gatti di diversi comuni toscani⁷; uno studio, infine, del 2006 nel comune di Pisa ha trovato una percentuale del 11,3 in 203 gatti sani.⁸

Sono maggiormente a rischio di infezione i gatti adulti malati, i gatti maschi interi e quelli che vivono all'aperto.³ La via di trasmissione naturale avviene attraverso inoculazione parenterale del virus presente nella saliva e nel sangue, verosimilmente attraverso ferite inferte da un morso o in combattimento.⁴ L'evidenza che sostiene l'importanza di questa via di trasmissione è l'osservazione che questo virus può essere trovato nella ghiandola salivare e nell'epitelio della ghiandola salivare durante un'infezione acuta e può essere rinvenuto nella saliva, nei linfociti del sangue e nel plasma o nel siero.⁴

La trasmissione tra madre e gattini è possibile ma solo una parte della cucciolata diventerà infetta. La quantità di cuccioli infetti in una cucciolata dipende dalla carica virale della madre durante la gestazione e alla nascita. Né la trasmissione oro-nasale né quella venerea sono state documentate in natura.³

PATOGENESI

Il bersaglio principale del virus FIV sono i linfociti T CD4+ attivati. Queste cellule funzionano come cellule T helper ed hanno un ruolo centrale nella funzione immunitaria, facilitando lo sviluppo dell'immunità umorale e cellulo-mediata. La glicoproteina dell'envelope gp120 si lega ad un recettore primario sulla superficie di membrana, la molecola CD134. La transcriptasi inversa virale che media la trascrizione del genoma RNA virale in una copia DNA perde la capacità di correzione; quindi il virus FIV muta rapidamente e dimostra grande diversità genetica.³

L'infezione diventa latente quando ad una cellula è stata integrata una copia provirale ma non produce particelle virali.³

Nei primi giorni dopo infezione sperimentale, il virus replica nelle cellule dendritiche, nei macrofagi e nei linfociti T CD4+; e nell'arco di due settimane si trova nel plasma.³

Sia il livello di virus nel plasma che il DNA provirale nelle cellule mononucleate del sangue cresce raggiungendo un picco ad 8-12 settimane post-infezione. Durante questo periodo l'animale può manifestare lievi e aspecifici segni clinici, quali anoressia, letargia e ipertermia, che si attenuano

velocemente. Mentre la linfadenopatia generalizzata, dovuta alla crescita del numero e della taglia dei centri germinativi attivati nei linfonodi, può persistere per settimane o mesi.³

La diminuzione della carica virale nel plasma segna l'inizio della fase asintomatica che può anche durare anni; questo implica un controllo da parte del sistema immunitario della replicazione virale. Durante questa fase la carica virale rimane stabile ma c'è un progressivo declino nel numero dei linfociti T CD4+, con un conseguente calo del rapporto CD4+:CD8+. In una parte dei gatti infetti questo porta ad un immunodeficienza funzionale, a segni clinici da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) ed infine alla morte.³

Le cause della perdita di cellule CD4+ possono comprendere: una diminuita produzione secondaria ad infezione del midollo osseo o del timo, una lisi delle cellule infettate indotta dal FIV stesso, una distruzione delle cellule infettate dal sistema immunitario stesso e un'induzione della morte per apoptosi. Inoltre la perdita di cellule CD4+ altera le risposte immunitarie perché le cellule CD4+ stesse hanno ruoli fondamentali nella produzione e nel mantenimento sia dell'immunità umorale che cellulo-mediata.⁴ Una certa parte di cellule CD4+, chiamata Treg, sembra giocare un ruolo fondamentale nell'immunosoppressione da FIV, infatti è stata documentata la presenza di cellule Treg con attività soppressiva durante infezioni da FIV precoci e croniche. Queste cellule, quindi, potrebbero avere una parte importante nella risposta immunitaria soppressa dei gatti FIV infetti agli agenti patogeni esterni.⁹

In alcuni casi, un aumento nella percentuale di cellule CD8+ contribuisce ad invertire il rapporto.

Nei gatti FIV infetti si possono trovare altre importanti alterazioni immunologiche. I linfociti provenienti da gatti infettati perdono la capacità di proliferare in risposta da una stimolazione antigenica. Anche le funzioni dei linfociti possono essere danneggiate da un'espressione ridotta o alterata delle molecole della superficie cellulare, come le CD4+ o gli antigeni del II complesso maggiore di istocompatibilità e i recettori dell'interleuchina 2, che hanno ruoli critici nell'amplificazione delle risposte immunitarie.⁴

In gatti FIV infetti è stata descritta una adesione e migrazione neutrofilica danneggiata in risposta a produzioni batteriche. L'attività delle cellule natural Killer può essere diminuita o aumentata in gatti infetti in fase acuta o asintomatica, rispettivamente.⁹ L'infezione da FIV è associata ad un'alterata produzione di citochine. I danni segnalati comprendono sia concentrazioni aumentate e diminuite del fattore α della necrosi tumorale sia un IL-6 aumentata.⁴

Un'altra manifestazione della disregolazione immunologica osservata nei gatti FIV infetti è un'eccessiva ipergammaglobulinemia che principalmente deriva da aumenti delle IgG. In conseguenza di questo aumento è stata descritta una crescita nel numero di immunocomplessi circolanti con conseguenti disordini da rilasci da immunocomplessi, come glomerulonefriti e uveiti.⁴

SEGNI CLINICI NON NEUROLOGICI

I segni clinici negli animali FIV infetti non sono specifici. La maggior parte di essi non è causata direttamente dal virus, ma è il risultato di infezioni secondarie. Il virus è, invece, responsabile di un'immunodeficienza (rendendo, quindi, il gatto suscettibile ad infezioni secondarie e a neoplasie) oppure di una stimolazione immunitaria (con il risultato di una malattia immuno-mediata).³

In uno studio del 2000 in gatti naturalmente infetti è stato osservato 18% di morte, 18% di malattia grave ma più del 50% dei gatti rimanevano clinicamente silenti nei primi due anni di osservazione.⁹

L'infezione sperimentale progredisce attraverso diversi stadi, simile agli stadi del HIV: una fase acuta, una fase clinicamente silente di durata variabile e una fase terminale chiamata "Sindrome da immunodeficienza felina acquisita".⁹

Nelle prime settimane/mesi post infezione possono evidenziarsi segni clinici transitori: piressia, letargia, linfadenopatia e neutropenia. In seguito i gatti infetti risultano privi di segni clinici; questo periodo asintomatico in molti casi durerà per anni e alcuni gatti non mostreranno mai segni clinici relativi all'infezione. Di solito i segni clinici si rendono manifesti in gatti di 6-8 anni o più.⁹

L'immunodeficienza o l'immunostimolazione si mostra frequentemente con forme di gengivostomatite cronica, rinite cronica, linfadenopatia, glomerulonefrite immunomediata e perdita di peso.⁹

In corso di FIV sono state riportate molte infezioni secondarie da virus, batteri, funghi, protozoi. Sono state anche riportate varie condizioni neoplastiche, tra cui linfosarcoma a cellule B, malattie mieloproliferative e carcinoma a cellule squamose.⁹

I sintomi della stomatite ulcero-proliferativa cronica felina vengono più comunemente presentati dai proprietari, con anoressia e letargia. Essa origina solitamente nell'area faringea e progredisce rostralmente, specialmente lungo la linea dentaria mascellare. Le lesioni sono spesso dolorose e la perdita di denti è comune. Istologicamente la mucosa è invasa da cellule plasmatiche e linfociti, accompagnata da vari gradi di infiammazione neutrofilica ed eosinofilica. La causa di questa patologia non è certa, ma le lesioni istologiche mostrano una risposta immunitaria ad una stimolazione cronica antigenica o una disregolazione immunitaria. Il fatto che questo sintomo non sia descritto in gatti sperimentalmente infettati e pathogen-free ci suggerisce un ruolo di altri patogeni secondari, ad esempio il Calicivirus è stato spesso identificato nelle cavità orali di questi gatti.⁹

Sono stati descritti problemi riproduttivi associati ad una positività al virus mediante metodo PCR nei tessuti placentari e fetali. Descritto anche un coinvolgimento renale con lesioni glomerulo

tubulo interstiziale, dovuti probabilmente ad immunocomplessi circolanti, associati a grave proteinuria.³

NEUROPATHOGENESI E SINTOMI NEUROLOGICI

Sintomi neurologici sono stati descritti sia in infezioni da FIV naturali sia sperimentali, in fase acuta e in fase cronica.¹⁰

Sono state osservate sia manifestazioni patologiche neurologiche centrali che periferiche, analogamente agli effetti del HIV sul sistema nervoso dell'uomo.^{10,11}

Sono stati osservati movimenti anomali della faccia e della lingua, comportamenti psicotici, leccamento compulsivo, demenza, perdita di controllo della vescica o dello sfintere anale, e disturbi del sonno. Altri sintomi sono nistagmo, atassia, convulsioni e tremori intenzionali.⁹

Inoltre sono stati documentati attività elettrica cerebrale anomala e anomali potenziali evocati acustici e visivi in gatti infetti che non presentavano segni neurologici visibili. Infatti sebbene la maggior parte dei gatti infetti non mostri segni neurologici evidenti all'esame clinico, una gran parte di essi mostra alterazioni istologiche al sistema nervoso centrale. Lesioni cerebrali possono essere riscontrate in assenza di infezione massiva e funzioni neurologiche anomale sono state documentate in gatti infetti con leggere o moderate evidenze istologiche di infiammazione.⁹

Le alterazioni patologiche includono: presenza di infiltrato perivascolare di cellule mononucleate, gliosi diffusa, noduli gliali e pallore della sostanza bianca. Queste lesioni di solito sono localizzate nel nucleo caudato, mesencefalo e tronco encefalico rostrale.⁹

Il virus entra nel cervello presto dopo l'infezione sperimentale, soprattutto attraverso la barriera emato-encefalica. Gli esatti meccanismi di entrata e i fattori che la influenzano non sono ancora del tutto accertati. Sembra che il fattore di necrosi tumorale TNF α giochi un ruolo fondamentale nella migrazione dei linfociti attraverso la barriera emato-encefalica.¹² A causa di questa infezione precoce del cervello, si sviluppano lesioni cerebrali virus indotte anche a due mesi post-infezione.¹³

Il virus non infetta direttamente i neuroni, comunque la morte neuronale è stata associata a questo virus; in particolare sono stati descritti danni al prosencefalo direttamente associati al FIV.⁹

Il tropismo neurologico di questo virus è altamente dipendente dal suo sottotipo. Sembra infatti che l'envelope sia il principale determinante della neuropatogenesi per il fatto che l'envelope, principale determinante di diversità molecolare, influenza direttamente la neuropatogenesi attraverso l'attivazione di proteasi selettive.⁹

L'esatto meccanismo del danno neuronale da FIV non è tuttora noto ma può includere: apoptosi neuronale, effetti sulla funzione di supporto neuronale di astrociti, produzione di sostanze tossiche

rilasciata da microglia infettata oppure produzione di citochine in risposta all'infezione virale.¹³ Studi in vitro supportano l'ipotesi che l'infezione da FIV possa alterare il normale metabolismo delle cellule del SNC, in particolare negli astrociti. Alterazioni documentate della funzione degli astrociti comprendono una comunicazione intercellulare alterata, una anormale attività della glutazione ridotta che può rendere le cellule più suscettibili all'insulto ossidativo e anomalie del potenziale di membrana mitocondriale che riduce le capacità di produrre energia della cellula.⁴

Una delle più importanti funzioni degli astrociti è quella di regolare la quantità di glutammato extracellulare, uno dei maggiori neurotrasmettitori eccitatori; un'eccessiva quantità di glutammato extracellulare spesso significa tossicità e morte della cellula nervosa.⁹ Inoltre, i livelli di calcio intracellulare sembrano avere un ruolo significativo, infatti cambiamenti di questi livelli possono portare ad una disfunzione neuronale. È stato dimostrato che i macrofagi del plesso corioideo si moltiplicano e rilasciano fattori tossici in presenza di infezione da FIV e che questi fattori destabilizzano l'omeostasi del calcio.^{14,15,16}

I cambiamenti del liquido cefalorachidiano (LCR) descritti in corso di infezione da FIV includono pleocitosi e aumento della concentrazione di IgG.⁹

Per quanto riguarda il sistema nervoso periferico è stata descritto un danno assonale coinvolgente sia le fibre di diametro piccolo che grandi nei gatti FIV infetti alla dodicesima settimana post-infezione.^{4,17}

Sono stati effettuati studi sulla polineuropatia sensitiva distale, complicazione neurologica descritta sia per FIV che per HIV, su gatti sperimentalmente infettati. L'esame istologico ha mostrato infiltrazioni di macrofagi attivati a livello di gangli spinali e nervo sciatico; inoltre TNF- α e RNA virale sono stati rilevati nella maggior parte dei nervi e dei tratti del midollo spinale, plasma e nervo sciatico. È stata documentata un'architettura assonale alterata nell'esame morfologico del nervo surale con riduzione della densità degli assoni demielinizzati, atrofia delle fibre, infiltrazioni di mononucleati sia nel perinevrio che nell'endonevrio.¹⁷

Infine è stata descritta una diminuzione della densità di fibre nervose intraepidermiche nei cuscinetti plantari dei soggetti infetti.¹⁷

DIAGNOSI

METODI DIRETTI

ISOLAMENTO DI VIRUS

Questo metodo è molto affidabile ma difficoltoso ed è poco utilizzato nella pratica clinica. Sono allestiti linfociti di sangue periferico da un campione di sangue eparinizzato e co-coltivati con cellule T feline primarie per 2-3 settimane, la presenza del virus è confermata dalla misura dei livelli di proteine core virale nei fluidi della cultura.³

PCR

Secondo alcuni studi e secondo le linee guida americane dell'Immunodeficienza felina la PCR è inferiore rispetto ai test sierologici. Secondo uno studio del 2005 la sensibilità ha un range di 41%-93% e una specificità che varia dal 81% al 100% nei gatti non vaccinati e dal 44% al 95% nei gatti vaccinati.¹⁸

E' doveroso sottolineare, però, che uno studio del 2007 ha documentato la nested PCR come un test sensibile, specifico, veloce e conveniente; quindi promettente per la diagnosi clinica di questa malattia, sottolineando che la presenza del virus è più realistico dei dati indiretti provenienti dalla sierologia.¹⁹

METODI INDIRETTI

RICERCA ANTICORPI

Test di routine per l'infezione da FIV ricercano anticorpi legati a proteine strutturali virali; questi test sono l'ELISA e il test Immunocromatografico. L'analisi Western Blot è ritenuta il gold standard e viene usata soprattutto per confermare casi dubbi.³

Il test rapido ELISA è basato sul riconoscimento degli anticorpi che si legano al p24 e alle proteine transmembranarie. Invece il test immunocromatografico ricerca solo anticorpi legati a corti peptidi delle proteine transmembranarie. Nel Western Blot il virus purificato è separato tramite la tecnica di elettroforesi su gel nei suoi vari componenti proteici, questo permette la ricerca di anticorpi verso ciascuna proteina virale strutturale.³

Sia il test ELISA che l'Immunocromatografico sono accettati e appropriati in molte situazioni ma hanno alcune limitazioni, infatti la specificità diagnostica dei test comunemente usati è sotto il 100%, dato molto importante soprattutto nelle popolazioni con bassa prevalenza e quando si testano gatti sani.³ Infatti, ogni test positivo in una popolazione con bassa prevalenza dovrebbe essere confermato con il Western Blot. Inoltre, si possono ottenere falsi-negativi nelle fasi iniziali

dell'infezione, quando il gatto è provirus positivo ma sieronegativo per diverse settimane fino a mesi, nella fase terminale della malattia a causa dell'immunodeficienza e nei casi in cui alti titoli virali nel sangue permettono il sequestro degli anticorpi contro FIV in immuno-complessi.⁹

Gattini nati da madri FIV infette possono risultare positivi a causa dell'immunità materna acquisita. In questi casi il cucciolo dovrebbe essere ritestato dopo le 16 settimane di età, quando gli anticorpi materni dovrebbero scendere sotto livelli non significativi; tuttavia in rari casi possono restare ad alti livelli fino ai 6 mesi di età. Quindi, un gatto positivo dopo le 16 settimane di età dovrebbe essere ritestato due mesi dopo, se ancora positivo allora il gatto è infetto.⁹

La vaccinazione contro il FIV produce una rapida e persistente crescita di anticorpi rendendo difficile la distinzione tra gatti positivi e gatti vaccinati, questi vaccini non vengono utilizzati in Europa ma bisogna fare attenzione nel caso di gatti importati e vaccinati in USA.⁹

E' inoltre possibile stadiare i livelli di disfunzione immunitaria attraverso indagine citofluorimetrica. Questo test non risulta, comunque, clinicamente utile.⁹

VIRUS DELLA LEUCEMIA INFETTIVA FELINA

MORFOLOGIA

Il virus della Leucemia felina è stato descritto per la prima volta nel 1964 da William Jarrett quando particelle di virus sono state viste al microscopio elettronico gemmare dalla membrana di linfoblasti maligni prelevati da un gatto con linfoma ad insorgenza spontanea. Questo virus infetta anche animali selvatici.⁴

E' un retrovirus a RNA con envelope.⁴

Il genoma a singola catena è trascritto inversamente in DNA, che di solito è integrato nel genoma della cellula ospite con un integrasi. Il DNA integrato è conosciuto come provirus. Dopo la transcriptasi inversa, inizia la sintesi di proteine virali secondo i meccanismi convenzionali di trascrizione con l'assemblaggio dei virioni vicini alla membrana cellulare e la gemmazione dalla cellula. L'infezione di una cellula da parte di retrovirus non porta di solito alla morte cellulare.²⁰

Il genoma del FELV contiene tre geni: l'envelope (env) che codifica per la glicoproteina gp70 (SU) e per la proteina di transmembrana, il gene polimerasi (pol) codifica per la transcriptasi inversa, la proteasi e l'integrasi e il gruppo specifico antigenico (gag) codifica per le proteine strutturali del virus inclusa la p27.²⁰

Il virus della leucemia felina si classifica nei sottotipi A,B,C e T, definiti in base alla cellula ospite; antigenicamente sono strettamente collegati. Il sottotipo A è ubiquitario ed è coinvolto in ogni infezione; il sottotipo B origina dalla ricombinazione di FeLV-A e enFeLV (virus endogeno); il sottotipo C è il risultato di una mutazione nel gene env; ed infine il sottotipo T è così definito a causa del suo linfotropismo T.²⁰

Il virus della Leucemia felina non sopravvive a lungo fuori dall'ospite ed è facilmente inattivato dai disinfettanti, dai saponi, dal calore e dall'essiccazione. Comunque il virus resta infettivo ad umidità e a temperatura ambiente per 24-48 ore;⁴ la trasmissione iatrogena può avvenire attraverso la contaminazione di aghi, strumenti chirurgici e trasfusione di sangue.²⁰

EPIDEMIOLOGIA

Il virus è diffuso in tutto il mondo. Diffonde in maniera contagiosa senza alcuna predisposizione di sesso e di razza.⁴ La sua prevalenza è influenzata dalla densità della popolazione felina, infatti la variabilità geografica è evidente.²⁰

Negli ultimi 25 anni la prevalenza e l'importanza di questo virus è diminuita vistosamente, grazie alla produzione di test disponibili, alla diffusa conoscenza della patogenesi e alla disponibilità di vaccini efficaci.²⁰

Uno studio del 1992 su 277 gatti malati stanziati in Italia ha evidenziato 18% di positività a FeLV⁵; un altro studio del 1994 su 432 gatti del nord Italia con diverse condizioni di vita ha documentato una percentuale del 2 % di positività⁶; ancora, in uno studio del 2002 si parla di 10,6 % in 349 gatti di diversi comuni toscani;⁷ uno studio, infine, del 2006 nel comune di Pisa ha trovato una percentuale del 8,4 % in 203 gatti sani.⁸

I gatti viremici fungono da fonte di infezione, infatti eliminano costantemente il virus tramite la saliva, le secrezioni nasali, le feci e il latte. Fattori di rischio per l'infezione sono la giovane età, la densità di popolazione e la scarsa igiene. L'infezione è trasmessa soprattutto attraverso il grooming (la pulizia del pelo attraverso il leccamento reciproco) reciproco, ma anche tramite morsi.⁴

Nelle gatte viremiche, la gravidanza di solito esita nella morte embrionale, nascite premature o nascita di cuccioli viremici che muoiono rapidamente. Nelle gatte gravide che si infettano tardivamente, di solito la trasmissione non avviene durante la gravidanza. Comunque raramente, alcuni cuccioli possono diventare viremici dopo la nascita; in questi casi la trasmissione avviene attraverso le ghiandole mammarie dove il virus può restare latente fino allo sviluppo della ghiandola nell'ultimo periodo della gravidanza. Con l'avanzare dell'età i gatti diventano più resistenti all'infezione.²⁰

PATOGENESI

In molti casi l'infezione inizia nell'orofaringe dove il virus infetta linfociti che vengono trasportati nel midollo osseo. In seguito alla rapida moltiplicazione nelle cellule del midollo osseo, vengono prodotti un grande numero di virioni e di conseguenza la viremia si sviluppa alcune settimane dopo l'infezione. La viremia porta all'infezione delle ghiandole salivari e della parete intestinale, quindi il virus è diffuso in grandi quantità nella saliva e nelle feci.^{4,20}

Frequentemente lo sviluppo della viremia o la stabilizzazione della viremia (viremia transitoria) viene sconfitta da un sistema immunitario ben funzionante. Questi gatti non sono di solito a rischio di sviluppare malattia.^{4,20}

Un gatto che ha controllato la viremia diventa infetto latente, una riattivazione può avvenire nel caso di grave stress cronico o patologie che portano ad immunosoppressione, non è ancora chiaro come questo accada ma si pensa che sia un evento piuttosto raro.^{4,20}

Storicamente FeLV era considerato responsabile di molte malattie mortali e di molte più sindromi rispetto agli altri agenti infettivi. E' stato proposto che circa un terzo di tutte le morti di gatti relative a neoplasia fossero causate da FeLV, come anche si è parlato un grande numero di gatti morti per anemia relativa a FeLV, oltre ad uno svariato numero di malattie infettive secondarie agli effetti soppressivi di questo virus sul midollo osseo e sul sistema immunitario. Oggi queste dichiarazioni

sono in via di revisione e la prevalenza e la conseguente importanza di FeLV è in diminuzione.⁹ Ancora però se questo virus è presente in una comunità felina con diverse infezioni endemiche (FIV, FeLV, Coronavirus, etc) risulta essere quello con il più alto impatto sulla mortalità. L'incidenza della mortalità di gatti sani persistentemente viremici negli ambienti con più gatti è circa il 50% in 2 anni e 80% in 3 anni. Le percentuali di sopravvivenza per i gatti persistentemente viremici mantenuti in ambiente domestico come singolo gatto è probabilmente migliore di quella precedente.⁴

SEGNI CLINICI

I segni clinici associati a FeLV sono molteplici. Le manifestazioni più frequenti sono: neoplasia, immunosoppressione, disordini ematologici, malattie immuno-mediate e altre sindromi come nefropatie, disordini riproduttivi e morte neonatale. Non è ancora del tutto chiaro il meccanismo che sostiene la diversa risposta clinica all'infezione da FeLV. Si pensa che il decorso clinico sia determinato da una combinazione tra il virus e fattori riguardante l'ospite. Alcune di queste differenze possono essere legate alle proprietà del virus stesso, come ad esempio un particolare sottogruppo maggiormente associato ad un quadro clinico.⁹

E' risaputo che la più importante discriminante per il decorso clinico è l'età del gatto al momento dell'infezione. Cuccioli neonati sviluppano una marcata atrofia timica dopo l'infezione, a cui consegue una grave immunosoppressione, deperimento e morte precoce. I gatti adulti acquisiscono una progressiva resistenza.⁹

Gatti infetti possono sviluppare atrofia timica e deplezione paracorticale dei linfonodi; linfopenia e neutropenia sono comuni. Inoltre i neutrofili perdono progressivamente la loro funzione chemiotattica e fagocitaria. In alcuni gatti la linfopenia può essere caratterizzata da una diminuzione soprattutto dei CD4+ T helper con conseguente inversione del rapporto CD4+/CD8+, ma più comunemente c'è una perdita di entrambi.⁹ L'immunosoppressione può permettere infezioni secondarie di agenti a cui i gatti sono solitamente resistenti, come Salmonella spp.; oppure può peggiorare il quadro causato da altri patogeni come poxvirus, Micoplasma haemofelis, Criptococcus. Alcuni problemi clinici come ascessi sottocutanei o riniti croniche possono avere bisogno di molto più tempo per essere risolte nei gatti positivi al virus.²⁰

Oltre all'immunosoppressione i gatti infetti da questo virus possono presentare patologie immuno-mediate causate da un'iperproduzione o da una produzione sregolata della risposta immunitaria al virus. Malattie immunomediate di esempio sono l'anemia emolitica (AHIA), la glomerulonefrite, l'uveite e la poliartrite.⁹

Nei gatti FeLV infetti sono, anche, comuni, i disordini ematopoietici, in particolare citopenie causate dalla soppressione del midollo osseo: ad esempio anemie (rigenerative o non), neutropenie persistenti, transitorie o cicliche, anomalie delle piastrine (trombocitopenia e trombocitopatia), anemia aplastica e sindrome panleucopenia-like.⁹

FeLV può causare diversi tumori nei gatti, più comunemente linfoma e leucemia, meno frequentemente altri tumori ematopoietici. Il meccanismo mediante il quale questo virus causa una malignità può avvenire mediante l'inserimento nel genoma vicino ad un oncogene cellulare, più frequentemente il myc, che determina l'attivazione e l'iperespressione di quel gene. Questo effetto determina una proliferazione eccessiva ed incontrollata di quelle cellule. In assenza di un'appropriata risposta immunitaria ne deriva una malignità monoclonale.⁴

Il linfoma è stato classificato in base alla sua localizzazione anatomica: forma timica o mediastinica; forma alimentare nel tratto digestivo; forma multicentrica o periferica; forma atipica con tumori singoli nei reni, nel SNC o nella cute.²⁰

Oggi giorno c'è una diminuita associazione tra il FeLV e il linfoma e la causa principale è il calo di infezione nelle popolazioni feline come risultato delle vaccinazioni efficaci e i programmi di controllo ed eliminazione degli infetti.⁹

Il fibrosarcoma associato a FeLV è causato da FeSV, un virus ricombinante che si sviluppa de novo nei gatti FeLV infetti attraverso la ricombinazione del genoma FeLV-A con oncogeni cellulari. Questo tipo di fibrosarcoma colpisce soprattutto i gatti giovani, cresce rapidamente, spesso con noduli multipli cutanei e sottocutanei localmente invasivi e con metastasi ai polmoni e ad altri siti.⁹ Altre sindromi direttamente causate da FeLV sono i disturbi riproduttivi, mortalità neonatale ed, infine, le neuropatie.

Sebbene molti dei segni neurologici registrati in gatti infetti fossero associati al linfoma e alle infiltrazioni linfomatose nel cervello o nel midollo spinali causanti compressione, in molti casi, invece, è stata sospettata una neurotossicità propria del virus. Sono stati descritti sintomi quali anisocoria, midriasi, cecità centrale, sindrome di Horner in gatti infetti senza cambiamenti morfologici.⁹

Sembra che un polipeptide dell'envelope di FeLV possa produrre un aumento del calcio libero intracellulare portando, così, a morte il neurone. Il polipeptide di un ceppo FeLV-C sembra essere più neurotossico dello stesso polipeptide derivato da un ceppo FeLV-A. Sono stati riportati altri segni clinici quali variazione di voce, iperestesia e paresi progressiva fino a paralisi. Immunoistochimicamente è stata rilevata una notevole espressione dell'antigene p27 di FeLV in neuroni, cellule endoteliali e cellule di glia, inoltre DNA provirale è stato amplificato da diverse

sezioni del midollo spinale. Questi ritrovamenti suggeriscono che in alcuni gatti infetti il virus può colpire le cellule del sistema nervoso.⁹

DIAGNOSI

METODI DIRETTI

ELISA (p27)

Questo test indica la presenza del p27 che è un marker di infezione ma non sempre di viremia.

Negli ultimi studi è descritta una sensibilità del 90% e una specificità maggiore del 98%.²⁰

IMMUNOCROMATOGRAFICO

La sensibilità e la specificità è comparabile all'ELISA.

Questi due test sopra citati sono i più comunemente utilizzati nella pratica veterinaria per la semplicità di esecuzione e la velocità di risposta.²⁰

IMMUNOFLUORESCENZA

Si basa sul principio che granulociti, linfociti e piastrine in gatti viremici contengono componenti Gag, che potrebbero essere osservati su uno striscio di sangue. Se comparato all'isolamento di virus, come test gold standard, la sensibilità dell'IFA è molto minore del 100%.²⁰

ISOLAMENTO VIRALE

Non utilizzato nella pratica clinica per i tempi eccessivi e i costi.²⁰

PCR

La PCR real-time permette non solo di verificare la presenza ma anche di quantificare il provirus FeLV.

La valutazione del RNA virale introduce nuovi aspetti nella diagnosi dell'infezione da FeLV. Usando questo test, l' RNA virale presente nel sangue intero, nel siero, nel plasma, nella saliva o nelle feci viene estratto, trascritto inversamente in cDNA, che è poi amplificato mediante la real-time PCR. Questa tecnica permette la ricerca e la quantificazione del virus in assenza di cellule.

E' importante sottolineare però che gatti che hanno superato la fase viremica restano provirus positivi ma non producono RNA virale nel sangue, saliva o feci.²⁰

METODI INDIRECTI

Sebbene sia possibile misurare i livelli di anticorpi contro FeLV, il risultato è di difficile interpretazione perché molti gatti producono anticorpi contro il loro virus endogeno. Quindi questi test hanno un'utilità clinica scarsa.²⁰

CAPITOLO 3

ELETTRODIAGNOSTICA. TEST UTILIZZATI

STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA

Gli studi di conduzione nervosa periferica permettono di valutare in modo obiettivo la funzionalità delle componenti motorie e sensitive dei nervi periferici. Si basano sull'utilizzo di stimoli elettrici che depolarizzano il nervo e quindi inducono la comparsa di un impulso elettrico nelle fibre nervose del nervo. Per ogni stimolazione si effettua la registrazione del potenziale d'azione muscolare (CMAP) a livello del muscolo innervato dal nervo testato nel caso delle fibre motorie, e del potenziale d'azione sensitivo (SNAP) nello stesso nervo nel caso delle fibre sensitive.²¹

Ci sono alcuni principi generali che l'operatore deve sempre rispettare:

- Gli elettrodi di stimolazione devono sempre essere posizionati in modo che il catodo (polo negativo) sia più vicino al sito di registrazione rispetto all'anodo (polo positivo) in modo da evitare un blocco di conduzione anodale dell'impulso propagato.
- Tutte le onde devono essere registrate ad una intensità di stimolo sopramassimale, cioè il 50% in più rispetto all'intensità di stimolazione richiesta per attivare tutti gli assoni. In questo modo l'intero pool di assoni è valutato indipendentemente dal loro diametro e dalla loro posizione spaziale rispetto agli elettrodi di stimolo.
- L'elettrodo di terra deve essere posizionato tra l'elettrodo di stimolazione e quello di registrazione in modo da diminuire gli artefatti di stimolo.²¹

E' sempre necessario utilizzare una contenzione farmacologica prima di sottoporre l'animale ai test.

STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA MOTORIA

Rappresenta il test più comunemente utilizzato nei piccoli animali per lo studio dei nervi periferici. Permette di stabilire la presenza di una lesione nervosa motoria e di caratterizzarne la natura e la localizzazione. I nervi più comunemente utilizzati sono l'ulnare, il radiale e più raramente il mediano per l'arto anteriore e il peroneo e il tibiale per l'arto posteriore.²¹

Il nervo da studiare si stimola in 2 o 3 punti lungo il suo decorso registrando il potenziale d'azione muscolare nel muscolo innervato dal nervo oggetto di studio. Gli elettrodi, un anodo (polo positivo) e un catodo (polo negativo) vengono posti lungo il decorso del nervo ad una distanza di circa 1-3 cm tra loro. Sono le cariche negative sotto il catodo che depolarizzano il nervo, quindi è necessario che il catodo sia più vicino alla sede di registrazione. Per lo stesso motivo la distanza tra i punti di

stimolazione si calcola da catodo a catodo. Come detto lo stimolo impiegato deve essere sopramassimale.²¹

La registrazione avviene mediante l'utilizzo di elettrodi ad ago. Quello attivo viene posizionato nel o sopra il ventre muscolare, mentre quello di riferimento sul tendine del muscolo. L'elettrodo di terra va posizionato tra stimolazione e registrazione.²¹

Il potenziale d'azione muscolare composito (CMAP) che viene normalmente registrato si presenta semplice o bifasico con un iniziale picco negativo (verso l'alto).

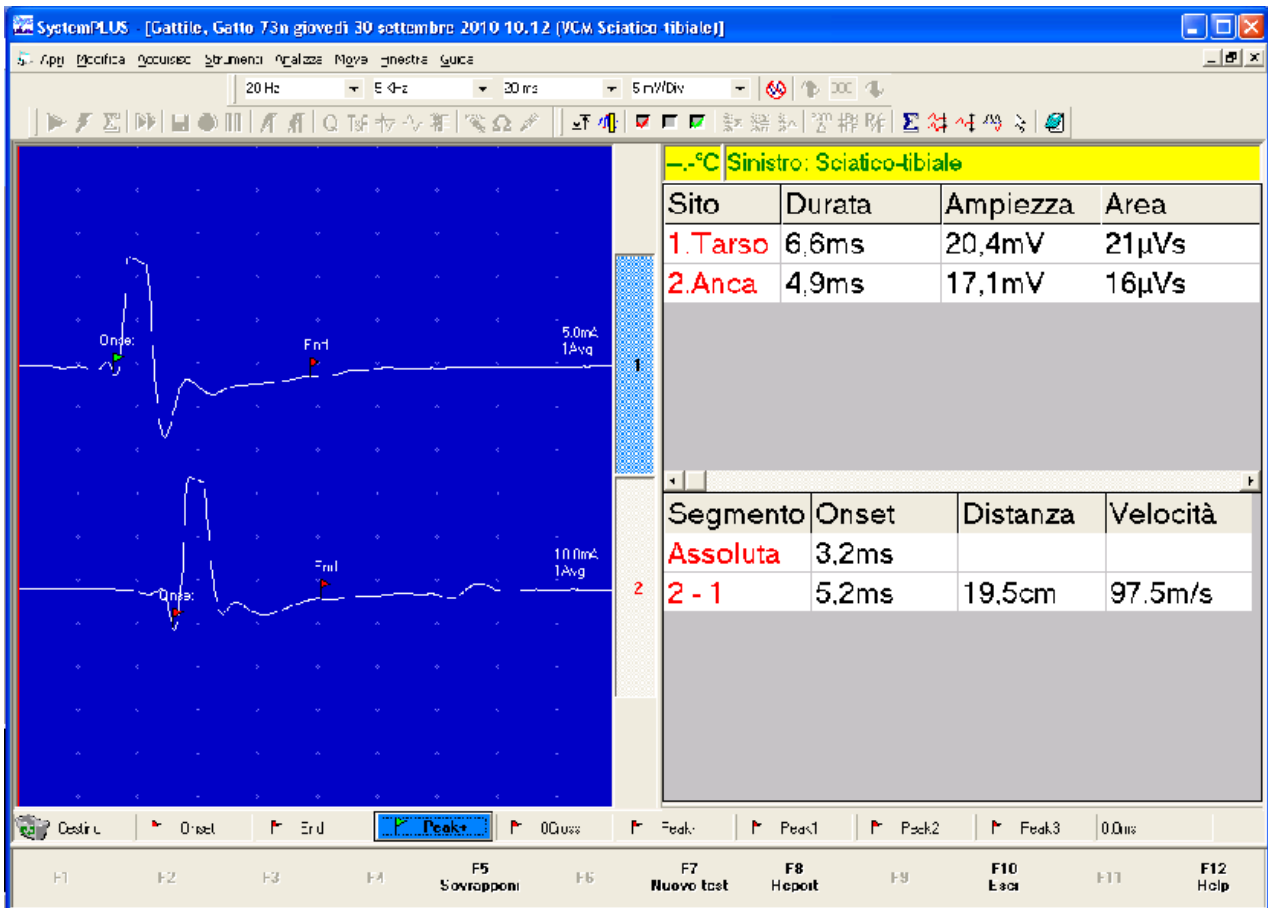


Figura 1. Registrazione dei tracciati di conduzione nervosa motoria (screenshot del software Systemplus)

Quando si valuta la componente motoria di un nervo periferico, devono essere analizzati alcuni parametri. Queste comprendono:

- La latenza del CMAP che è l'intervallo di tempo che intercorre tra lo stimolo e la prima deflessione del potenziale dalla linea isoelettrica. Indica il tempo di conduzione delle fibre più veloci
- L'ampiezza del CMAP che è la differenza di potenziale tra il massimo picco negativo e il massimo picco positivo ed è proporzionale al numero di assoni presenti
- La durata del CMAP che è il tempo che intercorre tra l'inizio e la fine del potenziale muscolare e si calcola dalla deflessione iniziale fino al ritorno finale alla linea isoelettrica.
- L'area del CMAP che è lo spazio delimitato da esso e come l'ampiezza dipende dal numero di assoni.
- La distanza tra le stimolazioni che si calcola tra il catodo della stimolazione prossimale e quello della stimolazione distale seguendo il più possibile il decorso anatomico del nervo.²¹

I parametri che vengono calcolati, in quanto necessari per l'interpretazione clinica del test, sono la Velocità di conduzione motoria, i rapporti tra ampiezza prossimale e distale e tra area prossimale e distale e la Latenza residua.²¹

La velocità di conduzione motoria (VCM) si calcola dividendo la distanza tra i due punti di stimolazione per la differenza di latenza tra i due CMAP usando la seguente formula:

$$\text{VCM (m/s)} = \frac{\text{Distanza (mm)}}{\text{Latenza prossimale-Latenza distale (ms)}}$$

La misurazione della VCM riflette il grado di mielinizzazione degli assoni che conducono più velocemente.²¹

Il rapporto ampiezza prossimale/ampiezza distale e il rapporto area prossimale/area distale sono più utili rispetto ai valori assoluti di area e ampiezza del CMAP; perché hanno intervalli di normalità più stretti e permettono di identificare i blocchi di conduzione.²¹

La Latenza residua è molto utile per valutare quelle neuropatie associate ad un coinvolgimento delle parti più distali del nervo e delle branche intramuscolari nervose. La latenza residua è la differenza di tempo tra la latenza distale osservata del CMAP e la latenza distale prevista sulla base della velocità di conduzione del nervo. Questa differenza dipende da fattori che rallentano la VCM nella

porzione terminale del nervo come: la riduzione dei diametri nelle porzioni terminali degli assoni e il ritardo sinaptico a livello di giunzione neuromuscolare.²¹

Quando si valuta la VCM e le onde CMAP bisogna tenere conto di alcuni aspetti fisiologici:

- Uno stimolo prossimale da' origine ad un potenziale evocato di durata leggermente maggiore e di ampiezza inferiore rispetto ad uno stimolo distale. Questo fenomeno è chiamato dispersione temporale fisiologica e dipende dal progressivo attardarsi dell'impulso condotto dalle fibre nervose lente rispetto a quelle più veloci.
- L'età del paziente ha una significativa influenza nella VCM. Infatti è più lenta nel cucciolo e raggiunge i valori normali dell'adulto tra i 6 mesi e l'anno di età nel cane e a 3 mesi nel gatto. Dopo i 7 anni nel cane e i 10 anni nel gatto si ha un progressivo decremento.
- Anche la taglia, ma in particolare la lunghezza dell'arto testato, ha una certa influenza. Infatti si ha una riduzione della VCM e dell'ampiezza del CMAP e un aumento della durata del CMAP direttamente proporzionale alla lunghezza dell'arto.
- La temperatura corporea è davvero importante: ogni grado centigrado in meno di temperatura dell'arto porta ad un decremento della VCM di 1,7-1,8 m/s nel cane.

Lo studio della conduzione motoria ci permette di valutare alcuni stati patologici ed in particolare di differenziare le forma demielinizzanti da quelle assionali.

Nelle forma demielinizzanti troviamo una diminuzione della VCM senza riduzione delle ampiezze del CMAP; una grave demielinizzazione che interessa fibre di diverso diametro determina dispersione temporale e polifasia del CMAP e in presenza di lesioni demielinizzanti gravi che interessano più di due internodi avremo un blocco di conduzione.

Nei danni assionali si riscontra una riduzione generalizzata di ampiezza del CMAP non associata a dispersione temporale. La VCM non si presenta ridotta, a meno che il danno non sia così esteso da colpire buona parte delle fibre che conducono più velocemente.²¹

STUDI DI CONDUZIONE NERVOSA SENSITIVA

Gli studi di conduzione nervosa sensitiva permettono di valutare la funzionalità delle fibre nervose sensitive nei nervi sensitivi e misti.

I nervi più utilizzati nel cane e nel gatto sono: tra i sensitivi il radiale superficiale laterale, il peroneo superficiale e il safeno; tra i misti il tibiale e l'ulnare.²¹

Dato che il potenziale d'azione sensitivo (SNAP) è registrato dal nervo stesso è di solito necessaria un solo sito di stimolazione e uno di registrazione per calcolare la velocità di conduzione.

La stimolazione viene effettuata distalmente con elettrodi ad ago inseriti in prossimità del nervo, con il catodo più vicino alla registrazione rispetto all'anodo. La terra tra stimolazione e registrazione.

I potenziali d'azione sensitivi (SNAP) sono molto inferiori in ampiezza rispetto ai CMAP, per questo è difficile separarli dai rumori di fondo elettrici. Quindi per minimizzare l'effetto dei rumori elettrici e delle contrazioni muscolari si usa una tecnica chiamata "signal averaging". In pratica si effettuano 250-500 stimolazioni e i relativi tracciati registrati si sommano tra di loro, ottenendo così un tracciato ripulito dai potenziali elettrici casuali.²¹

Il SNAP si presenta come un potenziale costituito da un iniziale picco positivo di ampiezza limitata seguito da un picco negativo di maggiore ampiezza.

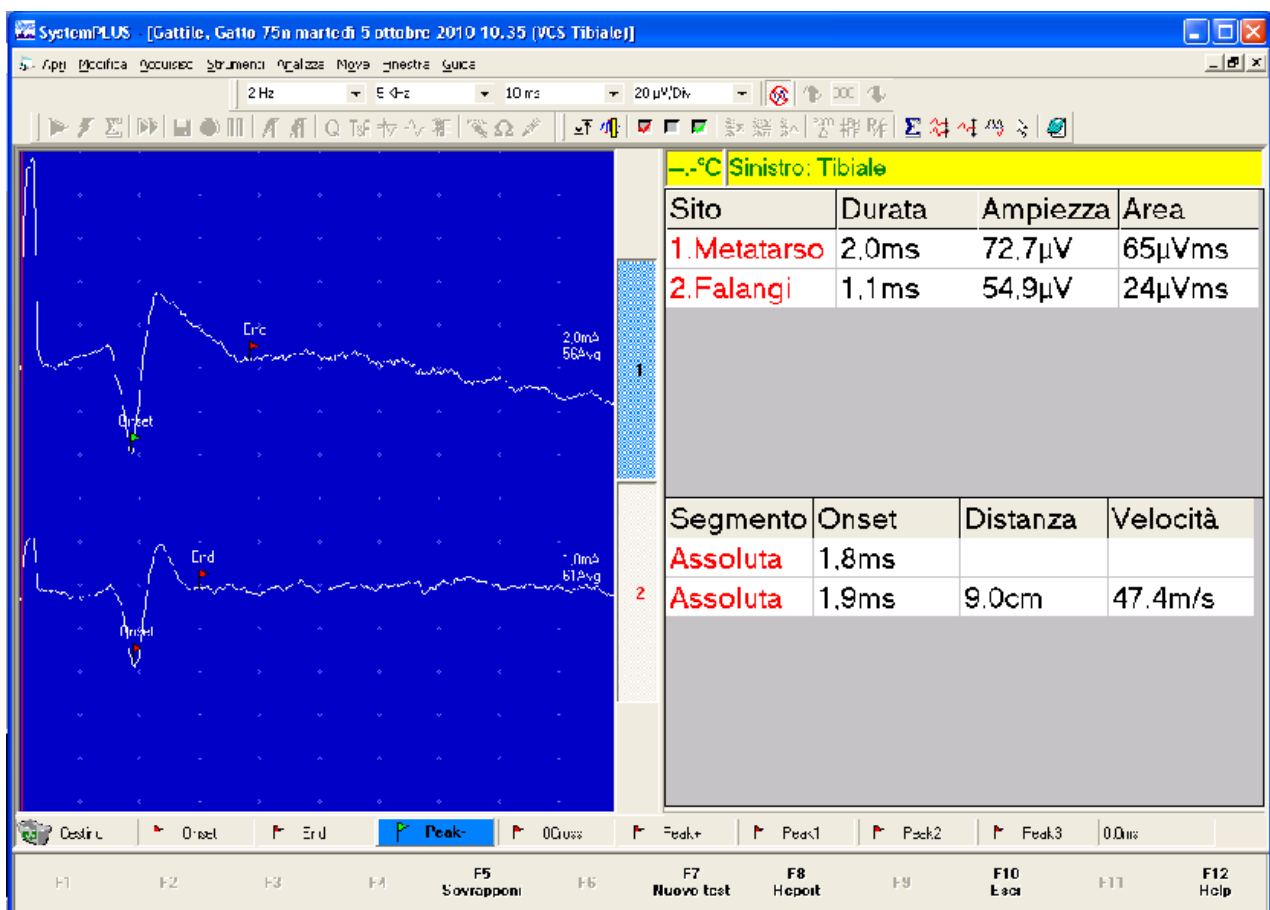


Figura 2. Registrazione dei tracciati di conduzione nervosa sensitiva

I parametri presi in considerazione sono:

- La latenza del SNAP è l'intervallo di tempo che intercorre tra lo stimolo e il picco positivo iniziale e indica il tempo di conduzione delle fibre nervose più veloci.
- L'ampiezza del SNAP è la differenza di potenziale tra il picco negativo e il picco positivo del SNAP. L'ampiezza è molto variabile e per questo poco utile dal punto di vista clinico.
- La durata del SNAP è il tempo che intercorre tra la deflessione iniziale e il punto in cui termina il picco maggiore del SNAP.
- La distanza è lo spazio che separa il catodo della stimolazione e l'elettrodo attivo della registrazione.

L'unico parametro che viene calcolato è la Velocità di Conduzione Sensitiva (VCS), che è un valore in metri al secondo che si ottiene mediante la formula:

$$\text{VCS (m/s)} = \frac{\text{Distanza tra stimolazione e registrazione in mm}}{\text{Latenza del SNAP in msec}}$$

Nel soggetto normale le velocità di conduzione sensitive medie sono più elevate rispetto a quelle motorie, infatti le fibre sensitive di diametro maggiore hanno soglie minori e conducono l'impulso più velocemente del 5-10% rispetto alle fibre motorie. Quindi anche stimolando nervi misti la velocità di conduzione registrata è quella delle fibre sensitive più veloci e non quella dovuta alla stimolazione antidromica delle fibre motorie.²¹

I fattori fisiologici che possono alterare la misurazione della VCS sono gli stessi riportati in precedenza per al VCM (età, taglia e temperatura corporea).²¹

Le alterazioni descritte per la conduzione motoria possono essere ugualmente applicate alla conduzione sensitiva. Un elemento importante da sottolineare è che le fibre nervose degenerano solo in caso di lesioni distali al ganglio sensitivo. Quest'informazione diventa fondamentale per differenziare un danno alle radici nervose dorsali pregangliari da una lesione più distale nel nervo. Infatti una lesione distale al ganglio delle radici dorsali determina una marcata alterazione o l'assenza di conduzione nervosa sensitiva, mentre una lesione radicolare prossimale al ganglio lascia immutata la conduzione nervosa sensitiva determinando un'alterazione solo del potenziale Cord Dorsum.²¹

ONDE F

L'onda F rappresenta un potenziale d'azione muscolare a lunga latenza prodotto dopo un'attivazione sopramassimale antidromica del nervo motore. Questo può avvenire simultaneamente ad una conduzione ortodromica dell'impulso nervoso dal sito di stimolazione, che produce una contrazione muscolare indotta (onda M). Quando l'impulso nervoso condotto ortodromicamente raggiunge il corpo cellulare (motoneurone del corno ventrale), inizia un segnale secondario condotto ortodromicamente che arriva al muscolo alcuni millisecondi dopo l'onda M.^{21,22}

Le Onde F rappresentano un evento motorio puro e sono un test di valutazione delle radici ventrali e della parte più prossimale dei nervi periferici motori e misti.²³

Valutando le Onde F le anomalie borderline della funzione motoria nervosa sono amplificate, poiché viene testata una via nervosa più lunga rispetto alle Onde M. Inoltre le latenze delle Onde F hanno un range di normalità più stretto rispetto al range della VCM, quindi si possono trovare anche cambiamenti di conduzione subdoli. Infine le onde F sono un test molto più preciso per valutare le polineuropatie o danni alle porzioni più prossimali e per valutare anomalie funzionali al tempo di riflessione nelle cellule del corno ventrale.^{21,22,23}

Un'onda F può essere prodotta da una stimolazione sopramassimale in qualunque punto di un nervo periferico motorio o misto. A causa delle variazioni delle latenze delle onde F, dovrebbero essere registrate da 10 a 16 onde per poter misurare la latenza minima.²²

Le onde F registrate sembrano essere più rappresentative dei neuroni motori con assoni che conducono più velocemente; per questo motivo è razionale pensare all'utilizzo della latenza minima delle onde F come una misura degli assoni che conducono più velocemente.²²

L'intervallo di alcuni millisecondi che può essere osservato tra l'onda F più precoce e quella più tardiva dopo stimolazione di un singolo nervo è rappresentativo della conduzione del nervo motore più veloce e più lento lungo gli assoni in quel determinato nervo e delle differenze in lunghezza nelle fibre terminali che innervano ciascuna miofibra.²²

I parametri misurati e valutati sono:

- La latenza dell'onda M
- La latenza dell'onda F
- La durata dell'onda F
- L'ampiezza dell'onda F
- La presenza in percentuale delle onde F
- La distanza misurata dall'angolo craniale della scapola alla punta del terzo dito per l'arto toracico e dal grande trocantere del femore alla punta del terzo dito per l'arto posteriore. Gli arti devono essere in estensione.

- F-ratio
- La velocità di conduzione dell'onda F

Vista la notevole variabilità della lunghezza degli arti dei cani sono stati stabiliti dei modelli di regressione lineare sulla base dei quali determinare le latenze minime normali dell'onda F.

La ridotta variabilità nella lunghezza degli arti dei gatti rende superflua l'elaborazione di modelli di regressione lineare per l'identificazione di valori normali della latenza minima dell'onda F. ^{21,22}

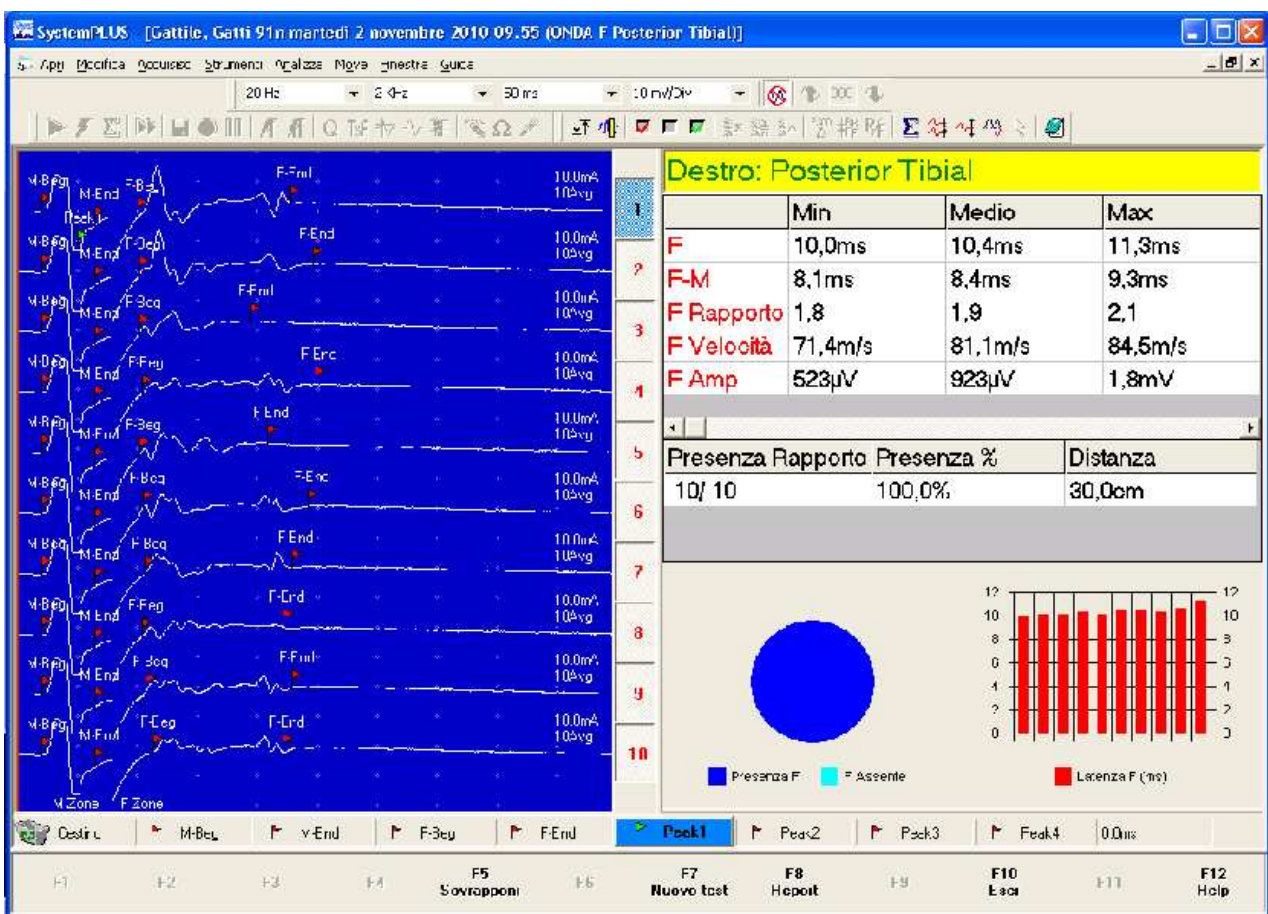


Figura 3. Registrazione delle Onde F

In particolare il rapporto chiamato F-ratio è un'accurata misura della conduzione del segmento nervoso prossimale comparato con il segmento nervoso distale (dal sito di stimolazione al muscolo).²¹

La formula per F-ratio è:

$$\text{F-ratio} = \frac{(\text{latenza dell'onda F} - \text{latenza dell'onda M}) - 1}{2 * \text{latenza dell'onda M}}$$

Sapendo che il tempo di riflessione del potenziale è 1 ms, (F-M-1)/2 è il tempo di conduzione tra il catodo e l'anodo di stimolazione e il corpo cellulare del nervo motore. Quindi (F-M-1)/2M è il rapporto tra il tempo di conduzione prossimale e distale.²²

Se l'F-ratio è più grande dei valori di riferimento pubblicati indica un maggior coinvolgimento del tratto prossimale. Se l'F-ratio è minore dei valori di riferimento, sta ad indicare invece un maggior danno alla parte distale del nervo. Se l'F-ratio è normale però sono state riscontrate altre anomalie nella funzione del nervo periferico e delle radici nervose, significa che la neuropatia è distribuita in modo uniforme al tratto distale e prossimale del nervo.²¹

La formula per il calcolo della Velocità di conduzione dell'onda F è:

$$\text{Velocità} = \frac{\text{lunghezza del nervo} * 2}{\text{Latenza dell'onda F} - \text{latenza dell'onda M} - 1} \quad ^{23}$$

POTENZIALE CORD DORSUM

Il Potenziale Cord Dorsum (CDP) è un potenziale elettrico che viene prodotto dai segmenti midollari in risposta a degli stimoli che raggiungono quei tratti di midollo spinale da nervi sensitivi o misti. Rappresenta quindi un evento puramente afferente (sensitivo), che può essere sfruttato per studiare le radici dorsali dei nervi spinali e le corna dorsali midollari.²²

Il potenziale prodotto consiste in un'ampia deflessione negativa (verso l'alto) seguita da una deflessione positiva a lunga latenza. Il CDP vero e proprio può essere preceduto da una serie trifasica di piccoli picchi, che rappresentano eventi extracellulari legati alla propagazione dei potenziali d'azione sensitivi nel midollo spinale.²²

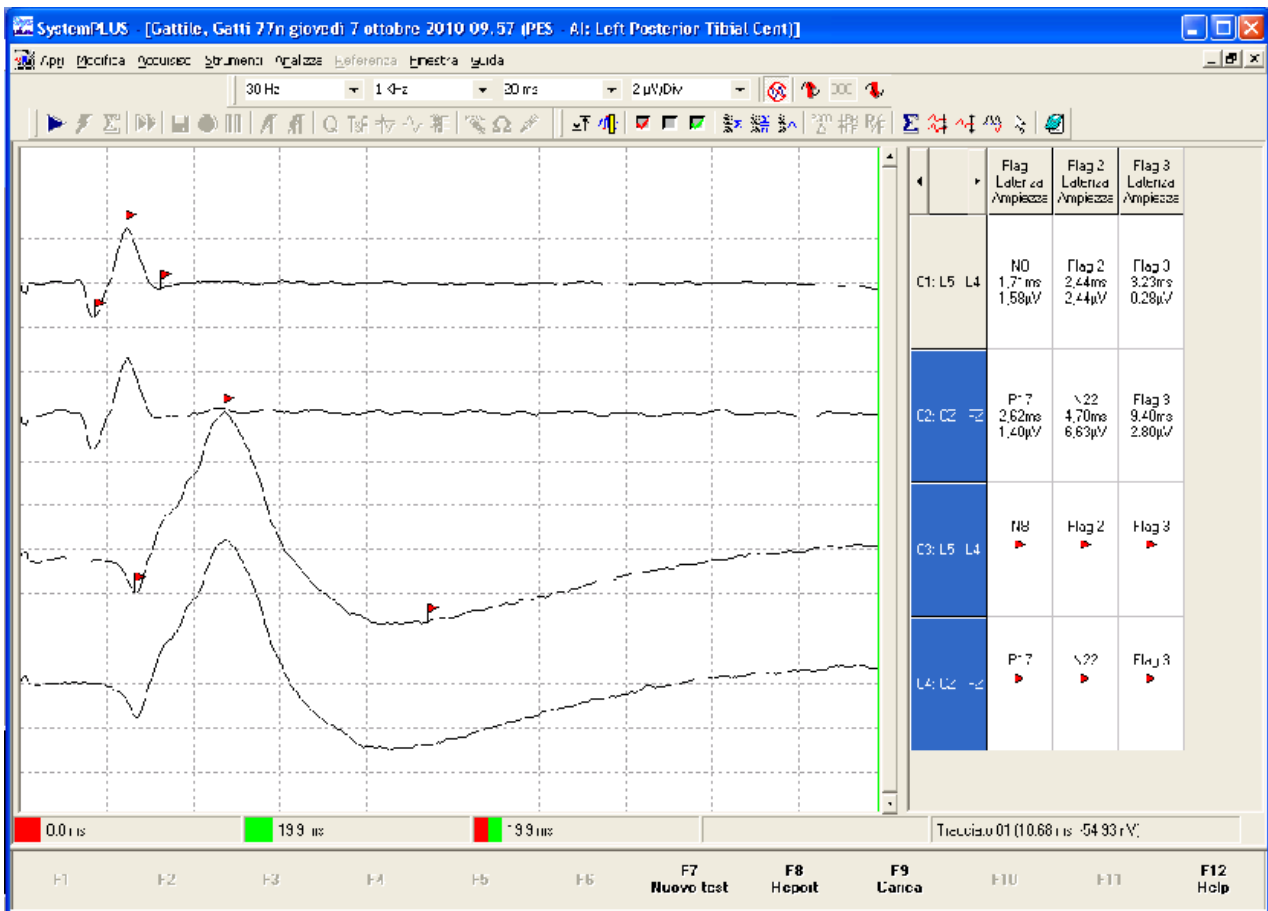


Figura 4 Registrazione del Potenziale Cord Dorsum (terzo e quarto tracciato)

Il largo picco negativo, che spesso contiene uno o due subpicchi più piccoli, rappresenta i cambiamenti nell'ambiente extracellulare prodotti dall'attività interneuronale del corno dorsale del midollo spinale. La prolungata onda positiva finale è, invece, la rappresentazione extracellulare della depolarizzazione efferente primaria.²¹

I nervi periferici che possono essere studiati nel cane e nel gatto sono il tibiale e il peroneo nell'arto posteriore e l'ulnare e il radiale nell'arto anteriore.²¹

Trattandosi di potenziali di ampiezza molto ridotta è necessario fare la media di almeno 500-1000 registrazioni per ottenere dei tracciati chiari, ripuliti dai disturbi elettrici concomitanti.²²

La valutazione del potenziale Cord Dorsum è un'importante parte dello studio di un nervo periferico nella sua componente sensitiva, poiché è un test accurato per la valutazione della gravità e della

distribuzione delle anomalie funzionali nei nervi sensitivi prossimali, nella radici dorsali e nelle corna dorsali del midollo spinale di cane e gatto.²¹

Di tale potenziale si valuta:

- La latenza del CDP
- La differenza tra la latenza iniziale e la latenza del picco del CDP
- Il tempo di conduzione sensitiva prossimale tibiale (PSCT), che è la differenza tra la latenza del Cord Dorsum e la latenza della corrispondente curva di conduzione nervosa sensitiva.²⁴

In letteratura sono presenti alcune formule per il calcolo dei valori normali di latenza del CDP dopo stimolazione del nervo tibiale del cane. Per quanto riguarda il gatto non sono ancora disponibili intervalli di normalità, ma la minore variabilità intraspecifica di taglia rende meno problematico il riconoscimento dei tracciati anormali.²¹

CAPITOLO 4

MATERIALI E METODI

ANIMALI

Sono stati testati 95 gatti riferiti presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Parma per l'esecuzione dell'intervento di sterilizzazione nell'ambito di un accordo di collaborazione con il Comune di Parma.

I gatti venivano sottoposti al seguente protocollo anestesiológico: sedazione con Imalgene 1000 (Ketamina) 10 mg/kg IM + Sedator (Medetomidina) 8 ug/kg IM a scopo preanestetico e per permettere il posizionamento di un catetere venoso; a questo punto in ciascun gatto è stato eseguito il prelievo dalla vena giugulare di campioni ematici, una parte raccolta in provette con EDTA per l'esecuzione di test sierologici per FIV e FeLV e una parte in provette da siero per stoccare 4 aliquote da 500 ul conservate a -20 °C per ulteriori esami futuri. Subito dopo gli animali sono stati posti in anestesia generale mediante intubazione e mantenimento in miscela di Isoflurano (1-1,5 %) in O₂ al 100 % e sottoposti all'intervento chirurgico presso l'Unità Operativa di Ostetricia e Ginecologia. Durante l'intervento è stata somministrata soluzione fisiologica a velocità di mantenimento endovena

TEST SIEROLOGICI

Per la diagnosi abbiamo utilizzato un test ELISA: Snap® Feline Triple FIV-FeLV-Filaria, IDEXX. Questo test è un test immunoenzimatico per la ricerca del virus dell'immunodeficienza felina per il virus della leucemia Felina e per l'infezione da *Dirofilaria immitis* nel siero, nel plasma o nel sangue intero con anticoagulante. Per quanto riguarda la FIV il test è indiretto infatti ricerca gli anticorpi contro proteine strutturali di membrana virale (p24/gp41), per quanto riguarda la FeLV e la *Dirofilaria immitis* il test è diretto, cioè ricerca gli antigeni e in particolare per la FeLV l'antigene p27.

In letteratura questi test rapidi sono stati ampiamente discussi: hanno una buona percentuale di sensibilità e specificità, sono molto pratici e consigliati anche dalle linee guida europee e americane.²⁶ In casi dubbi vengono comunque consigliati test di conferma.

ELETTRODIAGNOSTICA

Al termine dell'intervento chirurgico, sull'animale ancora in anestesia generale, sono stati svolti test elettrodiagnostici utilizzati di routine nella diagnosi delle patologie del Sistema Nervoso Periferico (Studi di Conduzione Nervosa, Onde F, Potenziale *Cord Dorsum*). Questi esami consistono nella valutazione della funzionalità nervosa mediante stimoli di diversa natura elettrica e nella registrazione delle loro risposte. La registrazione di questi potenziali elettrici prodotti dalle fibre nervose e muscolari avviene mediante l'utilizzo di piccoli elettrodi ad ago inseriti nel sottocute.

I tempi richiesti per l'esecuzione delle suddette indagini sono state in media di 15 minuti per ogni animale; durante questa fase i gatti sono stati mantenuti su materassino riscaldato e sottoposti a monitoraggio dei parametri vitali fino al risveglio. L'anestesia non è stata prolungata oltre i normali tempi di esecuzione degli interventi.

E' stato utilizzato un elettromiografo Myoquick (Micromed) Mogliano Veneto-TV- con aghi elettrodo subdermali monouso di 12 mm di lunghezza e 0,35 mm di diametro.

Sono stati effettuati test elettrodiagnostici sul 93,4% dei gatti FIV positivi (15 su 95), sul 100% dei gatti FeLV positivi (9 su 95) e sul 46,5% dei gatti risultati negativi (71 su 95).

Ogni gatto è stato accompagnato da una scheda individuale in cui venivano inseriti i dati di segnalamento (numero progressivo, data del test, numero di microchip, sesso e peso), dati relativi al risultato del test ELISA e allo stato clinico e le varie misurazioni necessarie per i calcoli elettrodiagnostici, compresa la temperatura corporea iniziale e finale.

Di ogni gatto è stato studiato il nervo tibiale. Il primo test eseguito sono stati gli studi di conduzione nervosa motoria: la stimolazione distale è stata effettuata sulla faccia laterale della zampa prossimamente al tarso, cranialmente al tendine del calcaneo; la stimolazione prossimale è stata effettuata sulla faccia laterale della zampa sul nervo sciatico caudalmente, in profondità, rispetto al grande trocantere del femore (tra questo e la tuberosità ischiatica); la registrazione è stata effettuata nei muscoli plantari interossei; la terra tra stimolazione e registrazione. Di questo test abbiamo valutato la latenza distale, la latenza prossimale, l'ampiezza distale, l'ampiezza prossimale, la distanza tra le stimolazioni e la velocità di conduzione motorie, secondo le modalità già descritte nel capitolo precedente.

Per quanto riguarda gli studi di conduzione nervosa sensitiva, nel caso dei nervo misti, si utilizzano gli stessi punti impiegati per gli studi di conduzione nervosa motoria. In particolare, si usa il catodo di stimolazione distale come punto di stimolazione e il catodo di stimolazione prossimale come elettrodo di registrazione per gli studi di conduzione nervosa sensitiva. Un'altra tecnica è quella di stimolare le porzioni più distali dei nervi, in corrispondenza delle aree di distribuzione delle branche sensitive dei nervi. I punti di stimolazione e di registrazione per il nervo tibiale sono: si stimola

sulla superficie plantare del piede in corrispondenza della porzione prossimale delle ossa metatarsali e si registra prossimamente al tarso, cranialmente al tendine del calcaneo. In questo studio sono state utilizzate entrambe le tecniche, in particolare la seconda per la valutazione della conduzione sensitiva e la prima per la comparazione con il Potenziale Cord Dorsum. Quindi in questo test, effettuando la seconda tecnica descritta, abbiamo valutato la latenza dello SNAP, l'ampiezza, la distanza tra la stimolazione e la registrazione e la velocità di conduzione sensitiva con la formula descritta nel capitolo precedente.

Per quanto riguarda le Onde F gli elettrodi di stimolazione e di registrazione per il nervo tibiale sono stati posizionati come per la stimolazione distale negli studi di conduzione nervosa motoria, con la differenza che l'anodo di stimolazione è distale al catodo. I dati valutati sono stati la latenza, l'ampiezza, la percentuale di presenza, la lunghezza dell'arto in estensione, F-ratio e la velocità con le modalità e le formule descritte nel precedente capitolo.

Infine, per quanto riguarda il Potenziale Cord Dorsum (CDP) gli elettrodi di stimolazione sono stati posizionati come nella stimolazione distale degli studi di conduzione nervosa del nervo tibiale, tranne nel fatto che l'anodo di stimolazione è distale al catodo. La registrazione è stata effettuata a due canali, ossia per la registrazione del CDP e per la registrazione della VCS nel prima tecnica descritta precedentemente. Quindi per la registrazione del CDP gli elettrodi sono stati posizionati a livello del legamento interarcuato L5-L6 quello attivo e l'elettrodo di riferimento nel sottocute, 3 cm lateralmente alla linea mediana; per la registrazione della VCS abbiamo riutilizzato il punto di stimolazione prossimale della VCM. I dati raccolti sono stati: la latenza, la latenza del picco, differenza tra le latenze e il PSCT secondo i calcoli descritti nel capitolo precedente.

CAPITOLO 5

RISULTATI

Dei 95 gatti testati con il test ELISA il 15,8 % è risultato FIV positivo e il 9,5 % FeLV positivo. Dei FIV positivi il 53,4 % era maschio, mentre il 46,6% era femmina; dei FeLV positivi maschi e femmine avevano una percentuale del 50% rispettivamente.

Di seguito riporto le tabelle di raccolta dei dati ottenuti con i test elettrodiagnostici:

- Tabella 1a Velocità di conduzione Motoria nei gatti FIV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat dist	Lat prox	Amp dist	Amp prox	Dist (mm)	Vel (m/s)
n°5	+	-	3,2	5,1	12,5	15,4	165	86,4
Milo	+	-	2,1	4,3	18,8	15,3	220	100
n°8	+	-	2,7	4,5	11,2	4	180	100
n°9	+	-	2,6	4	24	17,3	160	114,3
n°24	+	-	1,9	3,9	22,6	16,9	190	95
n°29	+	-	2,2	3,9	11	11,9	180	105,9
n°38	+	-	2	4,3	10,5	12,2	170	73,9
n°42	+	-	2,1	3,7	25,1	25,2	165	103,1
n°59	+	-	2	3,1	19,9	20,6	145	131,8
n°62	+	-	2,1	3,9	18,4	13,2	180	100
n°70	+	-	2,6	3,7	25	17,5	160	145,5
n°73	+	-	3	4,5	20,4	17,1	195	130
n°77	+	-	2,4	4,2	21,9	21	170	94,4
n°86	+	-	2	4	17,8	12	185	92,5
Media					18,5071	15,6857		105,2
DS					5,26329	5,07874		19,2766

- Tabella 1b Velocità di conduzione motoria nei gatti FeLV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat dist	Lat prox	Amp dist	Amp prox	Dist (mm)	Vel (m/s)
n°10	-	+	2,9	4,8	24,4	22	170	89,5
n°11	-	+	2	4	22,6	17,6	160	80
n°61	-	+	2	3,2	16,7	24,7	170	141,7
n°69	-	+	2,6	3,7	15,3	19,2	165	150
n°75	-	+	2	3,4	21,9	18,5	140	100
n°81	-	+	3,3	4,8	22,2	19,4	165	110
n°91	-	+	2,4	4,5	16,8	21	150	71,4
n°94	-	+	1,5	3,6	17,3	18,4	180	85,7
Media					19,65	20,1		103,538
DS					3,466163	2,34764		28,7141

- Tabella 1c Velocità di conduzione motoria valori fisiologici in letteratura

VALORI NORMALI	AMPIEZZA Dist (mV)	AMPIEZZA Prox (mV)	VELOCITA' (m/s)
Media	20,9	15,6	101,4
DS	3,4	4	12,9
Range	15,1-27,4	9,2-22,3	86,4-133,7

(Malik R., Ho S., 1989)

- Tabella 2a Velocità di conduzione Sensitiva gatti FIV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Latenza (ms)	Ampiezza (μ V)	Distanza (mm)	Velocità (m/s)
n°5	+	-	2,4	33	70	29,2
n°24	+	-	1,3	53	100	76,9
n°29	+	-	1,2	23	80	72,7
n°38	+	-	1,2	84	80	66,7
n°42	+	-	1,4	62	90	64,3
n°59	+	-	1,7	61	70	41,2
n°62	+	-	1,8	44,9	100	55,6
n°70	+	-	1,9	72	105	52,5
n°73	+	-	1,2	70	90	75
n°77	+	-	1,8	24	85	47,2
n°86	+	-	1,9	17,5	95	50
n°92	+	-	1,2	48	70	58,3
Media						57,46666667
DS						14,46841911

- Tabella 2b Velocità di conduzione Sensitiva gatti FeLV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Latenza (ms)	Ampiezza (μ V)	Distanza (mm)	Velocità (m/s)
n°10	-	+	1,4	9,6	90	64,3
n°11	-	+	1,3	76,2	75	57,7
n°61	-	+	1,2	45	100	83,3
n°69	-	+	1,7	20,5	80	47,1
n°75	-	+	1,9	63,8	80	42,1
n°81	-	+	1,9	66	105	55,3
n°91	-	+	1,5	77	70	43,8
n°94	-	+	1,5	49	80	50
Media						55,45
DS						13,4822635

- Tabella 2c Velocità di conduzione Sensitiva valori fisiologici in letteratura

VALORI NORMALI	VELOCITA' (m/s)
Media	64,88
DS	8,48

(Cuddon P.A., 2000)

- Tabella 3 a Onde F gatti FIV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat (ms)	Ampiezza	Dist (mm)	Vel (m/s)	F-Ratio	Pres (%)
n°5	+	-	11	0,498	260	91,2	0,7	90
xy	+	-	13	1,7	355	71,7	2,4	100
n°59	+	-	9,5	1,8	260	88,1	1,2	90
n°62	+	-	13,9	1,8	335	60,9	2,3	90
n°77	+	-	10,7	1,3	290	87,9	1,2	100
n°86	+	-	13,2	0,673	360	80	1,4	100
Media			11,8833	1,29517				95
DS			1,72675	0,53169				5,4772

- Tabella 3b Onde F gatti FeLV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat (ms)	Ampiezza	Dist (mm)	Vel (m/s)	F-Ratio	Pres (%)
n°11	-	+	9,6	1,1	290	86,6	1,7	100
n°69	-	+	13,2	5,2	295	57,3	2,6	90
n°91	-	+	19,5	0,555	300	36,1	4,3	60
n°94	-	+	8,9	0,537	330	120	1,1	80
Media			12,8	1,848				82,5
DS			4,8477	2,249887				17,078

- Tabella 3c Onde F dati fisiologici in letteratura

VALORI NORMALI	LATENZA (ms)	AMPIEZZA (mV)	PRESENZA (%)
Media	8,66	1,84	94,09
DS	0,47	0,9	4,9

(Ravera M. et al, 2010)

- Tabella 4 a Cord Dorsum gatti FIV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat (ms)	Lat Picco (ms)	Diff fra lat (ms)	PSCT (ms)
n°5	+	-	2,5	4,6	2,1	0,1
xy	+	-	3,1	5,1	1,8	
n°8	+	-	3,3	4,5	1,2	1,9
n°9	+	-	2,9	5	2,1	
n°24	+	-	2,6	4,4	1,8	1,3
n°29	+	-	1,8	2,7	0,9	0,6
n°38	+	-	2,6	4,2	1,6	1,4
n°42	+	-	2,5	4,3	1,8	1,1
n°59	+	-	2,2	4,2	2	0,5
n°62	+	-	2,8	5,3	2,6	1
n°70	+	-	2,8	4,8	2,1	0,9
n°73	+	-	2,9	4,9	2,1	1,7
n°77	+	-	2,8	4,9	2,2	1
Media			2,676923077			1,055556
DS			0,385473402			0,377859

- Tabella 4b Cord Dorsum gatti FeLV positivi

Gatto	FIV	FeLV	Lat (ms)	Lat Picco (ms)	Diff fra lat (ms)	PSCT (ms)
n°10	-	+	2,8	4,9	2,1	1,4
n°11	-	+	3,3	4,6	1,3	2
n°61	-	+	2,6	4,2	1,6	1,4
n°69	-	+	3	5,1	2,1	1,3
n°75	-	+	2,6	4,1	1,5	0,7
n°81	-	+	3,1	4,6	1,5	1,2
n°91	-	+	3,1	4,8	1,7	1,6
n°94	-	+	2,7	4,7	2	1,2
Media			2,9			1,35
DS			0,26186			0,370328

- Tabella 4c Cord Dorsum valori fisiologici in letteratura

VALORI NORMALI	LATENZA (ms)	PSCT (ms)
Media	3,02	1,35
DS	0,29	0,19

(Cuddon P.A., 2000; Bianchi E. et al., 2010)

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In letteratura sono disponibili molti studi sul neurotropismo dei virus FIV e FeLV e sulle relative patologie al Sistema Nervoso Centrale, soprattutto sul virus dell'immunodeficienza felina in quanto modello di studio per il virus dell'immunodeficienza umana. Per quanto riguarda invece il Sistema Nervoso Periferico si trovano pochi studi in letteratura.

Dei 95 gatti testati con il nostro test ELISA il 15,8 % è risultato FIV positivo e il 9,5 % FeLV positivo. Dei FIV positivi il 53,4 % erano maschi, mentre il 46,6 erano femmine; dei FeLV positivi maschi e femmine avevano una percentuale del 50% rispettivamente. Questi dati non si discostano di molto da quelli finora pubblicati.

Anche se non fa parte di questo studio, è corretto scrivere una nota sui dati ottenuti riguardo la prevalenza di *Dirofilaria immitis*. Su 95 gatti testati è stato trovato lo 0% di positività. Il confronto con i dati in letteratura è ampio: due studi del 2002 hanno segnalato 16% su 1045 gatti del Nord Italia e 24,9% su 349 gatti della Toscana. Una risposta a questa disparità è la differenza del test utilizzato, infatti mentre il nostro ricercava l'antigene per *Dirofilaria immitis*, gli studi precedenti hanno utilizzato un test indiretto per la ricerca di anticorpi.^{7,26}

Per quanto riguarda i risultati ottenuti con i test elettrodiagnostici, si è deciso di considerare i valori pubblicati in letteratura come valori di riferimento, perché alcuni gatti risultati negativi al test FIV-FeLV avevano valori patologici e non si è potuto escludere che avessero altre neuropatie non essendo stato possibile fare un esame neurologico prima della sedazione. Invece i gatti degli studi dai quali sono stati tratti i valori di riferimento erano tutti testati per FIV e FeLV ed erano del tutto normali all'esame neurologico.

Negli studi di conduzione nervosa motoria si possono notare alcune anomalie ma solo in 4 gatti FIV positivi e in 5 gatti FeLV positivi (vedi tabelle 1a, 1b e 1c):

- gatto n°5 (FIV+): ampiezza distale sotto la norma e la velocità di conduzione è bassa, ma ancora nei range di normalità;
- gatto n°8 (FIV+): entrambe le ampiezze basse;
- gatto n°29 (FIV+): ampiezza distale bassa
- gatto n°38 (FIV+): ampiezza distale e velocità di conduzione basse
- gatto n°11 (FeLV+): velocità di conduzione motoria bassa
- gatto n°69 (FeLV+): ampiezza distale bassa

- gatto n°91 (FeLV +): velocità di conduzione bassa
- gatto n°94 (FeLV+): velocità di conduzione bassa

Queste lievi alterazioni della conduzione nervosa motoria si sono rese maggiormente palesi e sono state amplificate dallo studio delle Onde F. Infatti possiamo notare latenze maggiori dei limiti fisiologici e ampiezze inferiori alla norma (vedi tabelle 3a, 3b e 3c).

Come già riferito, lo studio delle Onde F sono un test più preciso per quanto riguarda le fibre motorie: l'impulso che percorre antidromicamente le fibre motorie, dopo aver raggiunto gli alfa motoneuroni, ripercorre ortodromicamente le stesse fibre determinando la comparsa di un secondo potenziale d'azione muscolare. L'onda F è quindi un potenziale di natura esclusivamente motoria, che permette di evidenziare danni di lieve entità a carico delle fibre motorie, non rilevabili con gli studi di conduzione nervosa motoria.

Queste alterazioni hanno riguardato sia le ampiezze dei potenziali (CMAP e Onda F) sia le velocità di conduzione (latenza minima delle Onde F), di conseguenza possiamo ragionevolmente sospettare che il danno alle fibre motorie sia di tipo misto, ossia sia assonale che demielinizzante. La dimostrazione della presenza, in almeno alcuni dei gatti infetti, di alterazioni funzionali della conduzione nervosa motoria periferica rappresenta un dato interessante e nuovo. Infatti, una valutazione istopatologica ed immunoistochimica dei nervi colpiti potrebbe aiutare a comprendere i meccanismi patogenetici alla base di questa neuropatia.

Per quanto riguarda lo studio di conduzione nervosa sensitiva: nei soggetti testati non sono state evidenziate particolari anomalie, se non alcune velocità di conduzione sensitiva diminuite (gatto n°5, n°59, n° 77 nei FIV + e gatto n° 69, n°75, n° 91 nei gatti FeLV). L'assenza di particolari alterazioni anche dei potenziali Cord Dorsum conferma l'assenza di danni funzionali significativi a carico delle fibre sensitive dei nervi periferici. Alcuni studi pubblicati in passato¹⁰ descrivevano proprio alterazioni delle vie di conduzione sensitive. Questa discordanza con i dati raccolti in questo studio può essere spiegata col fatto che i gatti degli studi sopra citati erano stati sperimentalmente infettati con un ceppo neurotrofico di FIV. Il ceppo responsabile delle infezioni dei gatti di questo studio è un virus di campo, che può avere un tropismo differente. Inoltre tutti i gatti valutati in questo studio sono molto giovani, di conseguenza la malattia poteva sicuramente essere ad uno stadio precoce. Questi gatti potrebbero sviluppare alterazioni a carico delle vie sensitive in futuro. A questo riguardo sarebbe molto interessante poter monitorare dal punto di vista elettrodiagnostico le modificazioni a carico della conduzione nervosa periferica man mano che la malattia progredisce.

Si può pertanto concludere che l'infezione da virus dell'Immunodeficienza Felina e da virus della Leucemia Felina possono provocare alterazioni al Sistema Nervoso Periferico e non solo al sistema Nervoso Centrale, come già ampiamente discusso in letteratura.

Naturalmente è necessario ammettere i limiti oggettivi di questo studio: sui gatti non è stato eseguito un esame neurologico completo ma solo di tipo ispettivo, infatti questi gatti randagi erano per la maggior parte inavvicinabili prima della sedazione. Non è stato possibile effettuare un'esatta stadiazione della malattia né valutare la carica virale; e infine per ovvie ragioni non si è potuto seguire nel tempo l'infezione di questi animali, valutando le modificazioni nello stato neurofisiologico, come già detto per quanto riguarda lo studio di conduzione nervosa sensitiva.

Di particolare interesse sono stati i dati relativi alla diffusione del virus dell'immunodeficienza acquisita felina (FIV) e del virus della Leucemia Felina (FeLV), infatti non erano disponibili informazioni sulla loro diffusione nel Comune di Parma.

Il controllo della diffusione di questi virus è importante per il miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie delle aree occupate dalle colonie, infatti in seguito allo stato di immunodepressione i soggetti infettati da FIV e FeLV sono spesso colpiti anche da altri patogeni e quindi possono rappresentare un serbatoio per numerosi agenti infettivi (virus, batteri, protozoi, etc.), alcuni dei quali responsabili di indurre zoonosi (Toxoplasma e Criptococcus).

BIBLIOGRAFIA

1. Bortolami R, Callegari E. Neurologia ed estesiologia degli animali domestici. Bologna, Edagricole, 1999, p111ss
2. Aguggini G, Beghelli V, Clement M.G, D'Angelo A, Debenedetti A, Facello C, Giulio L.F, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. Torino, UTET spa, 2004, p.107ss
3. Hosie M.J, Addie D, Belàk S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Lloret A, Lutz H, Marsilio M, Pennini M.G, Radford A.D, Thiry E, Truyen U, Horzinek M.C. Feline Immunodeficiency ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2009) 11, 575-584
4. Sellon R.K. Infezione da virus dell'immunodeficienza felina. Cotter S.M. Neoplasia virale felina. In: Green G. Malattie infettive del cane e del gatto. Delfino, 2ed, 2003, p.71ss
5. Bandecchi P, Matteucci D, Baldinotti F, Gnudi G, Abramo F, Zozzini F, Bendinelli M. Prevalence of feline immunodeficiency virus and other retroviral infections in sick cats in Italy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (1992) 31, 337-345
6. Peri E.V, Ponti W, Dall'ara P, Rocchi M, Zecconi A, Bonizzi L. Seroepidemiological and clinical survey of feline immunodeficiency virus infection in northern Italy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (1994) 40, 285-297
7. Magi M, Prati M.C, Sebastiani B, Bandecchi P, Guberti V. Seroprevalence on feline heartworm disease in Tuscany. *Veterinari Record* (2002) 150, 415-416
8. Bandecchi P, Dell'Omodarme M, Magi M, Palamidessi A, Prati M.C. Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Veterinary Record* (2006) 158, 555-557
9. Hartmann K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2011) 143, 190-201
10. Phillips T.R, Prospero-Garcia O, Puaoli D.L, Lerner D.L, Fox H.S, Olmsted R.A, Bloom F.E, Henriksen S.J, Elder J.H. Neurological abnormalities associated with feline immunodeficiency virus infection. *Journal on General Virology* (1994) 75, 979-987

11. Fletcher N.F, Brayden D.J, Brankin B, Callanan J.J. Feline immunodeficiency virus infection: A valuable model to study HIV-1 associated encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2008) 123, 134-137
12. Fletcher N.F, Meeker R.B, Hudson L.C, Callanan J.J. The neuropathogenesis of feline immunodeficiency virus infection: barriers to overcome. *The Veterinary Journal* (2011) 188-3, 260-269
13. Hein A, Martin J-P, Dorries R. Early pathological changes in the central nervous system of acutely feline-immunodeficiency-virus-infected cats. *Virology* (2005)343, 162-170
14. Meeker R.B. Feline Immunodeficiency Virus Neuropathogenesis: from cats to calcium. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* (2007) 2, 154-170
15. Bragg D.C, Boles J.C, Meeker R.B Destabilization of neuronal calcium homeostasis by factors secreted from choroids plexus macrophage cultures in response to feline immunodeficiency virus. *Neurobiology of Disease* (2002) 9, 173-186
16. Bragg D.C, Hudson L.C, Liang Y.H, Tompkins M.B, Fernandes A, Meeker R.B. Choroid plexus macrophages proliferate and release toxic factors in response to feline immunodeficiency virus. *Journal of NeuroVirology* (2002) 8, 225-239
17. Kennedy J.M, Hoke A, Zhu Yu, Johnston J.B, Van Marle G, Silva C, Zochodne D.W, Power C. Peripheral neuropathy in lentivirus infection: evidence of inflammation and axonal injury. *AIDS* (2004) 18, 1241-1250
18. Crawford P.C, Slater M.R, Levy J.K. Accuracy of polymerase chain reaction assays for diagnosis of feline immunodeficiency virus infection in cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* (2005) 226(9):1503-7.
19. Arjona A, Barquero N, Domenech A, Terjerizo G, Collado V.M, Toural C, Martin D, Gomez-Lucia E. Evaluation of a novel nested PCR for the routine diagnosis of feline leukemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus (FIV). *Journal of Feline Medicine And Surgery* (2007) 9, 14-22
20. Lutz H, Addie D, Belàk S, boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie M.J, Lloret A, Marsilio F, Pennisi M.G, Radford A.D, Thiry E, Truyen U, Horzinek M.C. Feline Leukaemia ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2009) 11, 565-574
21. Cuddon P.A. Electrophysiology in neuromuscular disease. *Veterinary Clinics of north America: Small Animal Practice.* (2002) 32:1, 31-62

22. Bianchi E, Callegari D, Dondi M. Lo studio delle radici dei nervi mediante valutazione delle onde F, del Cord Dorsum Potential e del Riflesso H. *Annuario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma* (2003) 23, 79-86
23. Ravera M, Melis G, Bianchi E, Dondi M. F-waves of the ulnar nerve in clinically normal cats. *Proceedings of 22nd Annual Symposium of the ECVS & ESVN, Bologna 2009*
24. Bianchi E, Ravera M, Melis G, Dodi P.L, Dondi M. Proximal tibial sensory conduction time in dogs and cats: reference value. *Proceeding of 23rd Annual Symposium of the ECVN & ESVN, Cambridge 2010*
25. Hartmann K, Griessmayr P, Schulz B, Greene C.E, Vidyashankar A.N, Jarrett Os, Egberink H.F. Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2007) 9, 439-445
26. Kramer L, Genchi C. Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Veterinary Parasitology* (2002) 104, 43-50