

SPIERZIEKTEN BIJ HOND EN KAT DEEL 1: DIAGNOSE VAN EEN SPIERZIEKTE

A. Vanhaesebrouck¹, T. Bilzer², L. Van Ham¹

¹Vakgroep Geneeskunde en Klinische Biologie van de Kleine Huisdieren

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B- 9820 Merelbeke

²Institut für Neuropathologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstr. 5, D- 40225 Düsseldorf

anvhb@mail.be

SAMENVATTING

In dit eerste deel van een literatuuroverzicht over myopathieën bij hond en kat wordt de algemene benadering toegelicht van een patiënt verdacht van een spierziekte. Tot op heden berust de diagnose op de interpretatie van het klinisch-neurologisch beeld, het bloedonderzoek, het elektromyografisch onderzoek en het onderzoek van het spierbiopt. De eerste drie onderzoeken kunnen het vermoeden dat een patiënt lijdt aan een spierziekte ondersteunen. Zij geven geen uitsluitsel over de eigenlijke oorzaak. Momenteel wordt enkel het onderzoek van het spierbiopt beschouwd als de etiologische gouden standaard. Myotonia vormt hierop een uitzondering. Wegens de karakteristieke myotone ontladingen van het elektromyogram, is het onderzoek van het spierbiopt bij myotonia van gering belang. Tegenwoordig zijn meer en meer specifieke DNA-testen beschikbaar. In hoeverre deze het onderzoek van het spierbiopt bij erfelijke myopathieën zullen vervangen, zal de toekomst uitwijzen.

INLEIDING

Het doel van deze studie is een geactualiseerd literatuuroverzicht te brengen van de voornaamste myopathieën bij hond en kat vanuit een klinisch-diagnostische invalshoek. Zonder enige twijfel zullen in de nabije toekomst nieuwe spierziekten worden ontdekt. Neuromusculaire aandoeningen worden onderverdeeld in neuropathieën, synapsaandoeningen en myopathieën. Afhankelijk van de al dan niet spiergebonden oorzaak worden spieraandoeningen ingedeeld in primaire en secundaire ziekten. Uitgaand van de spierbiopsieresultaten worden zij verder geïnclassificeerd in degeneratieve en inflammatoire aandoeningen (Figuur 1). Na het algemene deel over de diagnosestelling van een spierziekte (deel 1) komen de verschillende myopathieën aan bod, ingedeeld naargelang hun oorzaak. Achtereenvolgens worden de primaire myopathieën toegelicht: de spierdystrofieën (deel 2), de metabole spierziekten (deel 3), de ionkanaalafwijkingen en de auto-immune spierziekten (deel 4). Het laatste deel (deel 5) behandelt de secundaire myopathieën, met name de endocriene en infectieuze spieraandoeningen.

De nosologie van spierziekten bij hond en kat staat nog in de kinderschoenen in vergelijking met de reeds vergaarde kennis in de humane geneeskunde. De diagnosestelling is complex. Voor een beter begrip van de beschrijving van de

verschillende specifieke spierziekten wordt in dit deel de algemene klinische benadering van een spierziekte voorgesteld. Achtereenvolgens worden de anamnese, het klinisch onderzoek en de complementaire onderzoeken nodig voor de diagnose van een spierziekte besproken. Tot deze laatste behoren de bloedanalyse, het radiografisch thoraxonderzoek, het elektromyografisch onderzoek, het spierbiopt en tot slot de DNA-testen.

SIGNALEMENT EN ANAMNESE

In de initiële benadering van een spierziekte speelt het signalement een grote rol (Glass en Kent, 2002). Erfelijke en/of congenitale spierziekten zijn namelijk meestal rasgebonden. Bovendien tasten de X-gebonden spierdystrofieën preferentieel mannelijke dieren aan (Figuur 2).

Spierzwakte vormt de hoofdklacht (Braund, 1997). Deze komt meestal permanent tot uiting, maar kan geaccentueerd worden na inspanning. Dit laatste is vooral duidelijk bij metabole spieraandoeningen (Blot, 2005). Een uitzondering hierop is myotonia, waarbij de spierzwakte juist verdwijnt na inspanning. Het tijdsverloop is slechts van relatief belang in de verdere differentiaaldiagnose. Degeneratieve spieraandoeningen zijn namelijk steeds chronisch progressief. Inflammatoire spieraandoeningen daarentegen kennen in principe een acute start, maar in

de praktijk gaat deze acute ontstekingsfase vaak onopgemerkt over in een chronisch atrofische fase. Een volgend element in de anamnese is de distributie van de spieraantasting. Deze kan namelijk focaal of gegeneraliseerd zijn. Een gegeneraliseerde spierziekte heeft meestal een bilateraal symmetrische en proximale distributie, met uitzondering van de distale myopathieën (Hanson *et al.*, 1998). De achterhand wordt vaak eerder aangetast dan de voorhand. Ook de inwendige skeletspieren, zoals tong-, farynx-, slokdarm- (mega-oesophagus), larynx- en/of ademhalingspijnen kunnen worden aangetast. De navraag naar verschijnselen als dysfagie, regurgitatie, dysfonie en dyspnoe is dus noodzakelijk (Glass en Kent, 2002). Tenslotte blijft een volledige anamnese essentieel, aangezien allerlei oorzaken secundair kunnen leiden tot een spierprobleem, met in het bijzonder metabole, infectieuze, toxische en nutritionele stoornissen (Figuur 1).

KLINISCH-NEUROLOGISCH ONDERZOEK

Tijdens het algemeen onderzoek worden alle orgaan-systemen systematisch overlopen. Spierzwakte kan immers niet alleen te wijten zijn aan neuromusculaire aandoeningen, maar ook aan cardiorespiratoire, metabole of orthopedische problemen (Figuur 1) (Platt en Garosi, 2004). Bijzondere aandacht wordt geschonken aan het ademhalingsstelsel (Glass en Kent, 2002). Koorts, hoesten en dyspnoe kunnen wijzen op verslikkingspneumonie, een vaak voorkomende en ernstige complicatie ten gevolge van mega-oesophagus. Een aantasting van het diafragma en/of de intercostaalspijnen kan ook leiden tot dyspnoe. Tachypnoe kan optreden door inspanningsintolerantie of compensatoir zijn aan metabole acidose. Dit laatste wordt voornamelijk opgemerkt bij mitochondriale myopathieën.

Zolang het dier zijn gewicht kan dragen, vertonen zowel de houdingsreacties (dubbeltreden) als de spinale reflexen (patella- en buigreflexen) tijdens het neurologisch onderzoek geen afwijkingen (Braund, 1997; Glass en Kent, 2002; Platt en Garosi, 2004). Hoewel het dubbeltreden de meest betrouwbare proprioceptietest is, zijn het huppelen en de kruiwagentest gevoeliger om een discrete spierzwakte aan te tonen. Bij vergevorderde spierzwakte kan een spierziekte een neuropathie imiteren. Bij myotonia ontstaan na spierpercussie spierrillingen die enkele seconden kunnen aanhouden.

De pijnperceptie blijft behouden of is zelfs versterkt, met name in de acute fase bij inflammatoire spieraandoeningen (Braund, 1997). Ze vermindert dus niet zoals bij neuropathieën. Een voorbijgaande spierzwelling wordt soms waargenomen in de acute fase van een inflammatoire myopathie. Myotonia daarentegen leidt tot ware spierhypertrofie. Hoewel een chronische spierziekte gepaard

kan gaan met compensatoire spierhypertrofie, domineert meestal de progressieve spieratrofie. Op termijn leidt fibrose aan de ledematen tot spiercontracturen en een verminderde gewrichtsbewegelijkheid.

De craniale zenuwreflexen functioneren normaal, tenzij na de aantasting van kauw-, tong-, larynx- of farynxspieren (Platt en Garosi, 2004). In principe worden geen bewustzijnsstoornissen vastgesteld behalve als de spieraandoening het gevolg is van een andere ziekte of als er systemische complicaties optreden, zoals verslikkingspneumonie (Glass en Kent, 2002).

Door de spierzwakte zakt het dier door zijn gewrichten en vertoont het een gehurkte houding die soms kan evolueren tot een planti- en/of palmigrade stand. Dit laatste wordt vooral waargenomen bij spierdystrofieën. Bij aantasting van de paraspinaalspijnen ziet men kyfose (Platt en Garosi, 2004), die in chronische gevallen soms overgaat in lordose. Bij aantasting van de nekspieren springt, vooral bij katten (wegens de afwezigheid van een nekband bij de kat) ventroflexie van de hals in het oog (Gaschen *et al.*, 2004). Soms ziet men een spontane spieractiviteit in rust, zoals fasciculaties of spiertremoren (Braund, 1997).

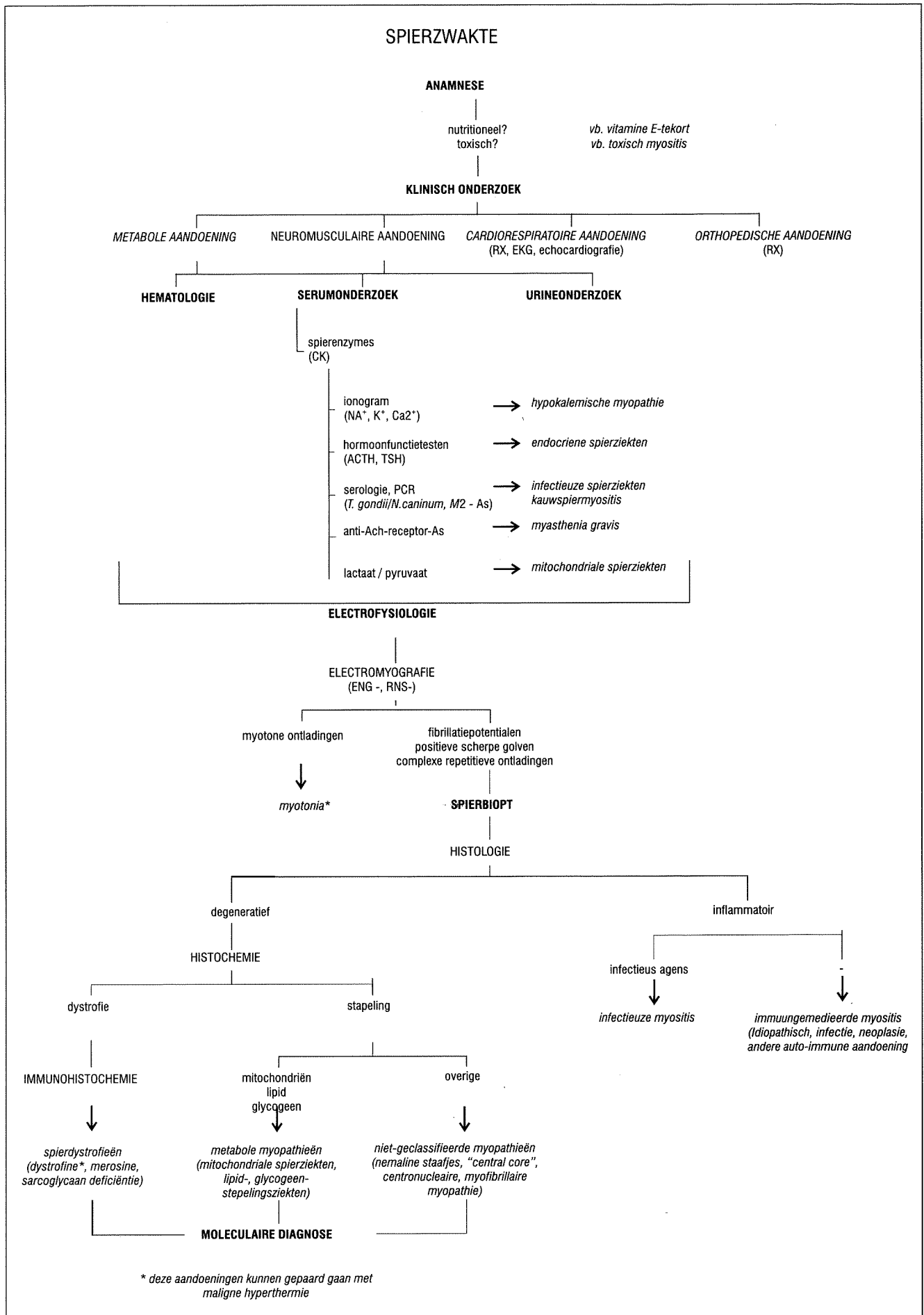
De gang wordt gekenmerkt door parese met korte en stijve passen en wordt soms beschreven als het "huppelen als een konijn" (Braund, 1997). In tegenstelling tot bij neuropathieën wordt hier zelden paralyse opgemerkt. Bij metabole aandoeningen ziet men vaak enkel de symptomen na inspanning zoals vermoeidheid tot krampen of collaps (Platt en Garosi, 2004).

DIAGNOSTISCHE TECHNIEKEN

Laboratoriumtesten en medische beeldvormingstechnieken

Bij elk dier verdacht van een neuromusculaire aandoening worden standaard een hematologisch onderzoek, een biochemisch serumonderzoek en een urineanalyse verricht (Figuur 1) (Glass en Kent, 2002). Met behulp van deze testen gaat men na of een infectieuze, metabole of immunologische stoornis aan de basis kan liggen. Specifiek voor een spierziekte zijn vooral het serumgehalte aan spierenzymen, het ionogram en de detectie van myoglobine in de urine van belang.

Het creatinekinase (CK) is het meest spierspecifieke serumenzyme (Aktas *et al.*, 1993). Het zorgt voor de transfer van de fosfaatgroep van het creatinefosfaat naar het ADP, waardoor het energierijke ATP wordt gevormd. Creatinekinase is een dimeer die bestaat uit een combinatie van een M- (muscle) en/of een B- (brain) subunit (Dawson *et al.*, 1965). Aldus kunnen 3 verschillende iso-enzymen gevormd worden. In zowel skelet- als hartspier over-



Figuur 1. Diagnose van een spierziekte. Beslissingsschema.



Figuur 2. X-gebonden spierdystrofie bij de Groenendaelse Herder: de aangetaste reu (rechts) is kleiner dan de niet-aangetaste teef (links).

heerst het MM-iso-enzyme (Aktas *et al.*, 1993). In de diergeneeskunde wordt iso-enzymbepaling weinig toegepast. Het CK stijgt na elke spierbeschadiging, zo ook na anorexie, inspanning of een intramusculaire injectie en na halothaananesthesie (Aktas *et al.*, 1995b; Aktas *et al.*, 1997; Fascetti *et al.*, 1997; Matwichuk *et al.*, 1999; Chanoit *et al.*, 2002). Om valsnegatieve resultaten te vermijden, moet de bloedname voor de CK-bepaling vlot en vóór het elektromyografisch onderzoek en de spierbiopsie gebeuren (Fayolle *et al.*, 1992; Strain *et al.*, 1998). Door de korte plasmahalfwaardetijd (2 uur) duidt het CK enkel een recente spieraantasting aan (Aktas *et al.*, 1995a). Bij spierziekten treedt de CK-stijging vooral op in de actieve fase van de spiercelbeschadiging. In chronische gevallen vermindert de spiermassa door atrofie en fibrose; bijgevolg daalt ook de concentratie van het serum CK. Hoewel sommige spierziekten, zoals de meeste spierdystrofieën, een extreme stijging van het CK kennen, vertonen vele slechts een lichte tot geen stijging (Blot, 2005). Bij jonge honden en katten ligt de serumspiegel van nature hoger (Aktas *et al.*, 1994; Cardinet, 1997; Levy *et al.*, 2006).

Minder spierspecifieke serumenzymen zijn het aspartaat-aminotransferase (AST), het alanine-aminotransferase (ALT) en het lactaatdehydrogenase (LDH) (Valentine *et al.*, 1990; Cardinet, 1997; Glass en Kent, 2002). Een veelbelovende techniek die spiernecrose aantoon met behulp van antistoffen gericht tegen het serummyoglobine (Holmgren en Valberg, 1992), is tot nu toe bij de hond onvoldoende gevalideerd (Neuman *et al.*, 2002). Wat betreft de elektrolyten zijn vooral de afwijkingen in het Ca^{2+} -, K^{+} - en Na^{+} -gehalte van belang.

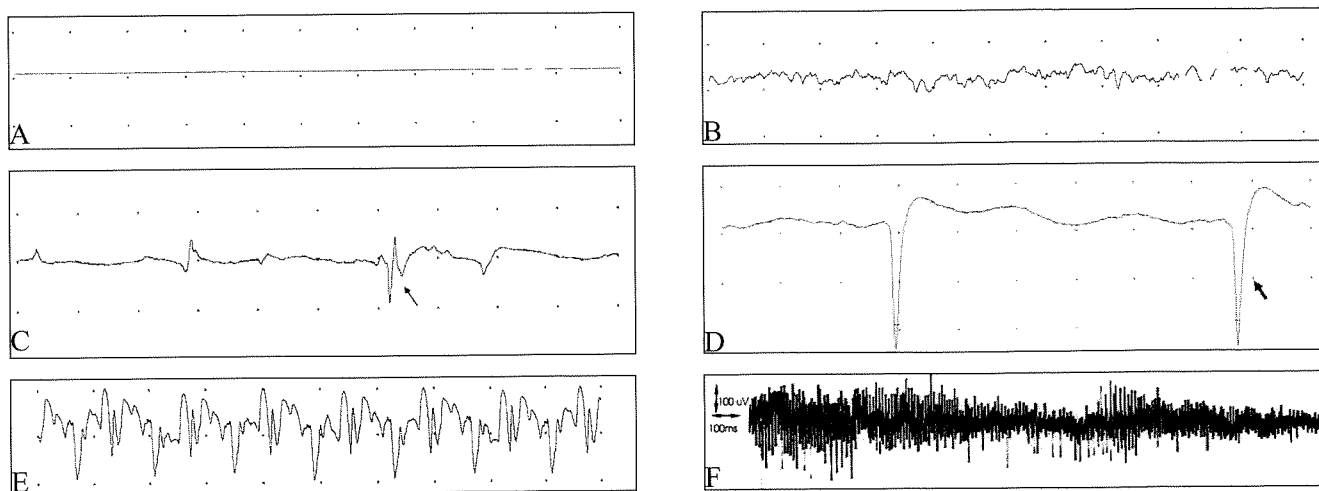
Myoglobulinuria wijst op een ernstige en acute spieraandoening en wordt gekenmerkt door een donkerbruine

urine (Shelton, 2004). De urinedipsticktest detecteert de haemgroep van zowel myoglobine als hemoglobine. Om het onderscheid tussen beide te maken, voegt men ammoniumsulfaat toe, waarbij het hemoglobine neerslaat en het myoglobine in oplossing blijft.

Andere specifieke testen (Figuur 1), zoals de Tensilon®-test, de TSH- en de ACTH-stimulatietest, zijn afhankelijk van de anamnese en de symptomen (Glass en Kent, 2002). Bij het vermoeden van infectieuze ziekten vraagt men de serologische antistoffentiter of de overeenkomstige polymerasekettingreactie (PCR)-test aan. Bij kauwspiermyositis kunnen de antistoffen gericht tegen de type 2M (masticatory)- of kauwspiervezels in het serum bepaald worden (Shelton *et al.*, 1985).

Bij inspanningsintolerantie of collaps na inspanning is het nuttig een arteriële bloedgasanalyse en een bepaling van het plasmalactaat en -pyruvaat in rust en na inspanning (of na het eten als inspanning onmogelijk is) uit te voeren (Platt en Garosi, 2004). Bij mitochondriale myopathieën is er namelijk een defect in de aërobe energieproductie. Pyruvaat wordt hierdoor onvoldoende snel in de mitochondriale energieketen verwerkt en wordt omgezet in lactaat. Bij lactaatopstapeling vertoont de arteriële bloedgasanalyse de typische kenmerken van een metabole acidose met respiratoire compensatie: een daling van de pH en het bicarbonaat, een hoge aniongap en een reflectoire daling van het pCO_2 door hyperventilatie. Dankzij de lactaat-pyruvaatverhouding kan men een eerste idee krijgen van de lokalisatie van het enzymdefect in de mitochondriale energieketen (zie deel 3). Voor de lactaatbepaling wordt bloed verzameld in een natriumfluoride- of kaliumoxalaatbuisje. Voor de analyse van het pyruvaat wordt bloed gemengd met 10% perchlooraat tot een 1:1 verhouding. Na het centrifugeren wordt het supernatans van beide buisjes afzonderlijk ingevroren tot $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Matwichuk *et al.*, 1999). De bekomen waarden zijn afhankelijk van de intensiteit van de inspanning en worden daarom steeds vergeleken met een controledier dat dezelfde inspanning heeft ondergaan (Matwichuk *et al.*, 1999).

Bij lipidstapelingsziekten (zie deel 3) kan het patroon van de aminozuren in plasma, zoals alanine (kolomchromatografie), en van de organische zuren in de urine, zoals lactaat en pyruvaat, (gaschromatografie/massaspectrometrie) behulpzaam zijn in het opsporen van het oorzakelijk enzymdefect (Moore *et al.*, 1958; Hoffman *et al.*, 1989). Bovendien kan men dankzij de kwantificatie van het totaal, vrij en veresterd carnitine in plasma, urine en spier (radio-isotoop enzym assay) een primair van een secundair carnitinetekort onderscheiden (Bieber en Lewin, 1981). Deze gespecialiseerde technieken zijn echter duur en dienen dus enkel na histopatho-



Figuur 3. Elektromyografisch onderzoek (horizontale verdeling 100 ms, verticale verdeling 100 μ V) A. De "rustmembranaanpotentiaal" vormt de basislijn van het elektromyogram B. "Eindplaatactiviteit" wordt gekenmerkt door een rimpelende basislijn C. "Fibrillatiepotentialen" zijn bi- of trifasisch waarbij de eerste afwijking positief (neerwaarts) is (zie pijl) D. "Positieve scherpe golven" bestaan uit een positieve piek (zie pijl) gevolgd door een trage negatieve golf E. "Complexe repetitieve ontlading" en "pseudomyotone ontladingen" worden gekarakteriseerd door een salvo van hoogfrequente en polyfasische ontladingen, alle met dezelfde frequentie en amplitude F. "Myotone ontladingen" worden getypeerd door een opeenvolging van potentialen in fasen van stijgende of dalende amplitude en frequentie.

logische bevestiging van een lipidstapeling aangevraagd te worden (Shelton *et al.*, 1998).

Bij regurgitatie is het aangewezen een radiografisch en/of fluoroscopisch thoraxonderzoek uit te voeren om een eventuele mega-oesophagus op te sporen. Bij het toedienen van een contraststof moet het risico op een verslikkingspneumonie afgewogen worden tegenover de gewonnen informatie (Glass en Kent, 2002). Het electrocardiografisch onderzoek en het echocardiografisch onderzoek kunnen de diagnose leveren van een begeleidende cardiomyopathie.

Het elektromyografisch onderzoek

Het elektromyografisch onderzoek meet de elektrische activiteit door middel van naaldelektroden geplaatst in een spier. Wegens het trofisch effect van een zenuw op een spier treedt een wijziging van de elektrische spieractiviteit niet alleen op bij een spieraandoening maar ook bij een perifere zenuwaandoening. Denervatie is echter slechts elektromyografisch zichtbaar na 5 tot 10 dagen (Bowen, 1987).

Er bestaan verschillende soorten elektroden waarbij de monopolaire (referentie en actieve elektrode in 2 afzonderlijke elektroden) en concentrische (referentie en actieve elektrode in 1 gemeenschappelijke elektrode) naaldelektroden de meest gebruikte zijn (Bowen, 1987). Eerst wordt de grondelektrode subcutaan ter hoogte van een beenuitsteeksel geplaatst (Sims, 1983). Daarna worden de referentie-elektrode en de actieve elektrode ter hoogte van de te onderzoeken spier respectievelijk subcutaan en intramusculair ingebracht. Potentiaalverschillen tussen de actieve elektrode en referentie-elektrode worden omgezet in pieken door

middel van een oscilloscoop en simultaan omgezet in geluid (Bowen, 1987).

In principe kunnen alle skeletspieren getest worden. Routinematig worden de paraspinaalspiers en de hoofdspieren van de voor- en achterhand getest (Chrisman *et al.*, 1972). Laryngo-faryngeale, slokdarm-, kauw- en sfincterspieren kunnen bijkomend worden onderzocht. Voor de praktische uitvoering van dit onderzoek wordt verwezen naar andere bronnen (Bowen, 1987).

Dit onderzoek vindt bij kleine huisdieren meestal onder algemene anesthesie plaats om ongewenste, vrijwillige bewegingen te vermijden. De meeste anesthetica zijn geschikt voor dit spieronderzoek, met uitzondering van ketamine (Chrisman, 1972).

De spiercelmembranen in rust is uitwendig elektropositief en inwendig elektronegatief geladen (Cunningham, 1997). Dit wordt veroorzaakt door de selectieve ionenpermeabiliteit van de celmembranen en de negatief geladen intracellulaire proteïnen. De natrium-kaliumpomp pompt natrium- en kaliumionen respectievelijk uit en in de cel. Hierdoor wordt een osmotische gradiënt opgebouwd. Bij de stimulatie van de spiercel verandert deze rustmembranaanpotentiaal in een actiepotentiaal. Deze bestaat uit twee fasen. Tijdens de depolarisatie stromen natriumionen passief via de spanningsafhankelijke natriumionkanalen in de cel. Vervolgens openen de kaliumionkanalen zich waarlangs kaliumionen passief uit de cel stromen. De rustmembranaanpotentiaal wordt hierdoor hersteld.

Spieren in rust zijn normaal elektrisch stil. De basislijn op het elektromyogram komt overeen met de rustmembranaanpotentiaal (Figuur 3A). Een opwaartse of neer-

waartse afwijking beschouwt men respectievelijk als een negatieve of positieve piek. Toch kunnen twee typen van normale elektrische activiteit in rust worden vastgesteld (Sims, 1983; Cuddon, 2002): insteek- en eindplaatactiviteit.

“Insteekactiviteit” wordt mechanisch uitgelokt gedurende het plaatsen van de elektromyografische naalden. Ondertussen hoort men een knisperend geluid. Deze uitbarsting van elektrische activiteit stopt zodra de naald niet meer beweegt. Een verlengde insteekactiviteit wijst op een neuro- of myopathie.

“Eindplaatactiviteit” wordt opgewekt wanneer de elektromyografische naald zich ter hoogte van een neuromusculaire synaps bevindt (Figuur 3B). Dit wekt een vrijstelling van acetylcholine ter hoogte van de eindplaat op. Het wordt vergezeld van een continu eindplaatgeruis (Sims, 1983). Afwijkingen in frequentie en amplitude duiden op een synapsprobleem (Cuddon, 2002).

“Motorunit actiepotentialen” ontstaan tijdens vrijwillige contractie van een normale spier door de ontlading van de motorische eenheid (Sims 1983; Cuddon, 2002). Door het uitlokken van reflexen of gewichtsverplaatsing kunnen bij kleine huisdieren bewegingen geïnduceerd worden, weliswaar zonder algemene anesthesie (Sims, 1983). De pieken zijn bi- of trifasisch met een eerste negatieve afwijking. Bij een myopathie en neuropathie dalen respectievelijk de amplitude en de densiteit van de pieken.

Membraaninstabiliteit door een neuro- of myopathie levert vier abnormale typen van spontane activiteit: fibrillatiepotentialen, positieve scherpe golven, complexe repetitieve ontladingen en myotone potentialen.

“Fibrillatiepotentialen” en “positieve scherpe golven” ontstaan door ontlading van één enkele spiervezel (Figuur 3 C-D) (Sims, 1984; Cuddon, 2002). Het verschil tussen beide is enkel te wijten aan de plaats van de elektrode ten opzichte van de ontlading. Het geluid bij fibrillatiepotentialen klinkt als bradende eieren. Positieve scherpe golven klinken iets dieper.

“Complexe repetitieve ontladingen” of “pseudomyotone ontladingen” ontstaan door synchrone ontlading van meerdere spiervezels (Figuur 3E) (Cuddon, 2002). Men hoort een constant motorgeluid (Sims, 1984).

“Myotone potentialen” worden veroorzaakt door asynchrone ontlading van meerdere spiervezels (Figuur 3F) (Cuddon, 2002). Het hoorbare bommenwerpergeluid is het kenteken bij uitstrek van myotonia (Sims, 1984).

Het elektromyografisch onderzoek geeft valsnegatieve resultaten, maar zelden valspositieve resultaten. Elektromyografische afwijkingen zijn niet specifiek voor een welbepaalde neuromusculaire aandoening, met uitzondering van myotone ontladingen die pathognomonisch zijn voor myotonia (Blot, 2005). Aangezien elektromyo-

grafische afwijkingen kunnen voorkomen bij zowel een spier- als zenuwprobleem, dient verder elektroneurografisch onderzoek (motorische en sensorische zenuwgeleidingsnelheid) uitgevoerd te worden om een neuropathie uit te sluiten (Brown en Zaki, 1979). Bij dieren met een myopathie is er geen afnemende musculaire respons bij repetitieve zenuwstimulatie (decrementietest).

Het spierbiopt

Een vriessnede voor histologisch, enzym- en immunohistochemisch onderzoek is meestal onontbeerlijk voor de classificatie van een spieraandoening en het stellen van de etiologische diagnose (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002). Doordat fixatie leidt tot de contractie van de spiereiwitten en de denaturatie van de enzymen, is de informatie gehaald uit monsters gefixeerd in 3,7 % formaldehyde bijgevolg gelimiteerd tot het herkennen van infectieuze organismen en tumorale cellen of ontstekingscellen (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002). Het elektronenmicroscopisch onderzoek bewijst zijn nut bij de identificatie van opgestapeld materiaal (Dickinson en LeCouteur, 2002). Tegenwoordig wint de biochemische analyse ten opzichte van het spiermonster aan belang, namelijk voor het meten van de enzymactiviteit bij enzymdeficiënties en voor de kwantificatie van eiwitten, zoals carnitine bij lipidstapelingsziekten (Braund, 1991).

Een aangetaste spier, maar geen eindstadiumspier wordt bemonsterd. Dit wordt afgeleid uit het klinisch en elektromyografisch onderzoek. De normale morfometrie van de spier moet gekend zijn (Braund en Lincoln, 1981; Kuzon *et al.*, 1981; Braund *et al.*, 1982, Braund *et al.* 1988, Braund *et al.* 1995). Dit is een kwantitatieve, morfologische procedure, waarbij verschillende morfologische parameters, zoals de spiervezeldiameter en de verhouding van de verschillende spiervezeltypen, die verschillen van spier tot spier, berekend worden (zie verder). Naargelang het pathologisch laboratorium krijgen bepaalde spieren de voorkeur. Ieder traumatisch artefact moet vermeden worden. Daarom wordt het spierbiopt contralateraal aan het elektromyogram genomen. De kans op de identificatie van karakteristieke letsels wordt aanzienlijk verhoogd wanneer meerdere spieren worden bemonsterd. Ideaal is de combinatie van een spieren zenuwbiopt (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002).

Na de incisie van de huid en fascia kan de bioptname op drie manieren uitgevoerd worden. De meest gebruikte en de beste biopsietechniek is de open chirurgische methode (Braund, 1991; Amann, 1998; Dickinson en LeCouteur, 2002). Verschillende spierbiopten worden zo atraumatisch mogelijk en volgens de spierrichting bemonsterd. Men maakt hiervoor eventueel gebruik van steunhech-

tingen of van een spierbioptieklem. Voor het histologisch en histochemisch onderzoek moet het monster een voldoende omvang hebben (1 cm lengte x 0,5 cm diameter). Dit laat de latere oriëntatie voor een dwarse vriessnede toe. Het elektronenmicroscopisch onderzoek daarentegen vergt een iets dunner biopt, zodanig dat het fixatief snel het volledige weefsel kan doordringen. Dit monster wordt onmiddellijk gefixeerd samen met de spierbioptieklem of vastgehecht aan een houten spatel om contractie door fixatie tegen te gaan (Dickinson en LeCouteur, 2002).

Twee andere in de literatuur beschreven chirurgische technieken zijn de punchbiopsie (Bley *et al.*, 2001) en de percutane naaldbiopsie (Reynolds *et al.*, 1995). Bij deze technieken wordt respectievelijk een huidbiopsiepunch en een gewijzigde 11-Gauge-spierbiopsienaald gebruikt. Door de moeilijke oriëntatie bij een latere snede van het bekomen naald- of punchbiopt zijn ze eerder nuttig voor de opvolging van de behandeling, de screening van erfelijke aandoeningen of voor het experimenteel spieronderzoek dan voor het stellen van een diagnose. Ze genieten echter de voorkeur wanneer een algemene anesthesie een risico inhoudt.

De verdere verwerking van het spierbiopt hangt af van het uiteindelijke onderzoek. Voor het histochemisch onderzoek heeft men dus nood aan een vriessnede. De verwerking tot vriessnede vindt echter enkel in gespecialiseerde laboratoria plaats (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002). Het spierbiopt wordt daar gedurende enkele seconden ondergedompeld in isopentaan dat vooraf gekoeld werd in vloeibare stikstof. Nadien worden de monsters ingevroren bewaard tot snede met behulp van de cryostaat. Het monster voor het ultrastructureel onderzoek daarentegen wordt na de bioptname onmiddellijk samen met de spierbioptieklem of de houten spatel in 4% glutaraaldehyde ondergedompeld gedurende 24 uur (Dickinson en LeCouteur, 2002). Eventueel kan ook een monster in 3,7% formaldehyde worden gefixeerd voor histologisch onderzoek om tumor- of infectieuze cellen op te sporen. Hiervoor wacht men één tot twee uur alvorens het te fixeren om artefacten door contractie te vermijden (Amann, 1998).

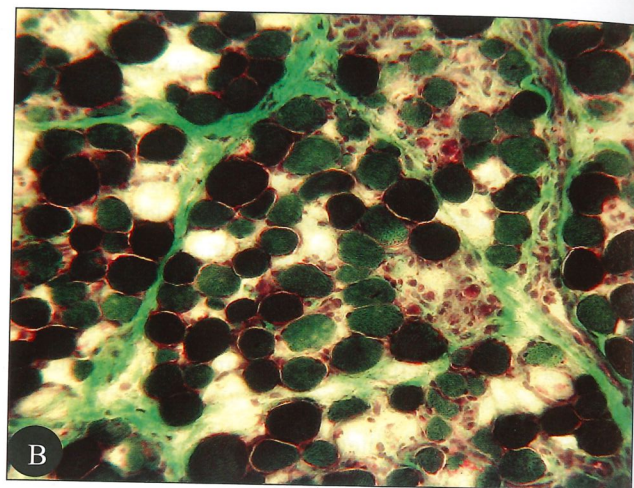
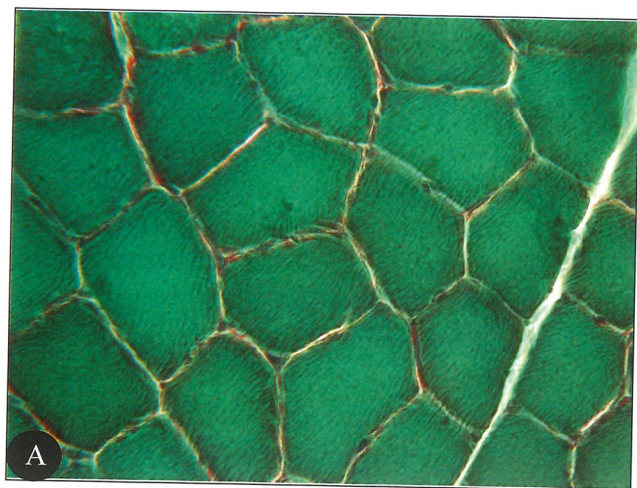
Wegens substraatlabiliteit, autolyse en uitdroging dient het spiermonster bestemd voor vriessnede zo snel mogelijk naar een gespecialiseerd laboratorium te worden gezonden. Mits een correcte bewaring bedraagt de tijdslimiet tussen de staalname en het invriezen slechts 30 uur (Braund en Amling, 1988). Na 6 uur treedt reeds een stijging in de spiervezeldiameter op, waardoor morfometrie nutteloos wordt. Deze spiermonsters worden, gewikkeld in een vochtig kompres, in een steriel luchtdicht recipiënt geplaatst. Het transport van deze spiermonsters, eventueel samen met de stalen voor biochemische analyse, gebeurt

in een isolerende box gevuld met droog ijs of cold packs (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002).

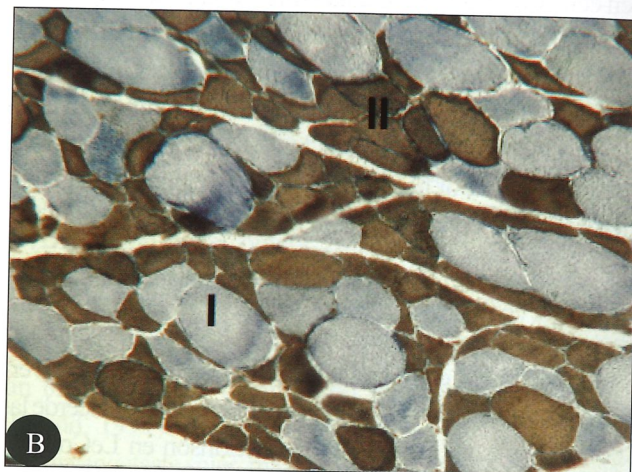
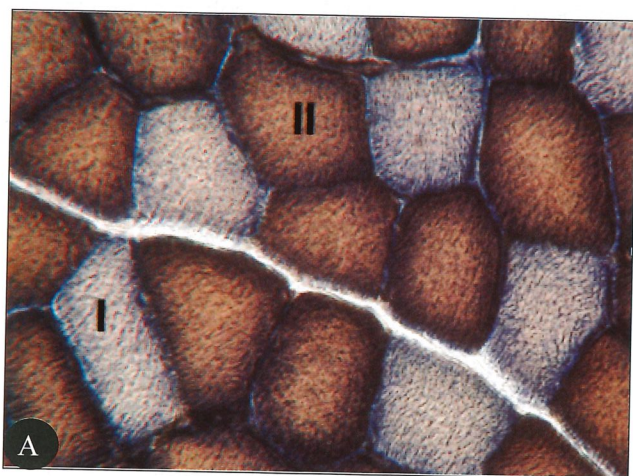
Het histologisch onderzoek dient als eerste oriëntatie. Standaard worden hiervoor de hematoxyline-eosine (HE) - en de gomoritrichoomkleuring gebruikt. Chronologisch onderscheiden we twee stadia na een spieraantasting. De acute fase wordt gekenmerkt door spiervezeldegeneratie en -regeneratie en de chronische fase wordt gekarakteriseerd door compensatoire spierhypertrofie en fibrose. Musculaire degeneratie en necrose uitend zich als eosinofiele tot bleke spiervezels na HE-kleuring. Met het doel deze spiervezels op te ruimen, verschijnen macrofagen. Calcium kan neerslaan in de necrosehaarden. Basofiele spiervezels na HE-kleuring duiden op een poging tot regeneratie. Tijdens dit herstel stijgt het aantal satellietcellen. Deze bevatten duidelijke nucleoli en migreren naar het midden waar ze kernrijen vormen. De spiervezel kan zich hierbij in twee splitsen. Uiteindelijk treedt fibrose op tussen de spiervezels en -bundels en wordt de spier volledig vervangen door bindweefsel en vet (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002).

Het daaropvolgend enzymhistochemisch onderzoek spoort zowel morfologische als biochemische afwijkingen op (Braund, 1991; Dickinson en LeCouteur, 2002). Voor een goed begrip van dit onderzoek is een basiskennis van de normale spierfysiologie noodzakelijk.

Elke spier is opgebouwd uit verschillende spiercellen of -vezels. Een skeletspier is hoofdzakelijk opgebouwd uit twee spiertypen: het trage type 1 en het snelle type 2 (Braund *et al.*, 1978; Braund en Lincoln, 1981; Kuzon *et al.*, 1981; Braund *et al.*, 1982; Braund *et al.*, 1988; Braund *et al.*, 1995). Type 1-spiervezels zijn vooral afhankelijk van het oxidatief metabolisme. Ze zijn rijk aan mitochondriën en kennen een relatief kleine spiervezeldiameter. Aangezien zij het best aangepast zijn voor continue contractie, vormen zij het overwicht in de antigraviteitsspieren. Type 2-spiervezels daarentegen halen hun energie vooral uit de anaërobie stofwisseling. Zij zijn arm aan mitochondriën en hebben een iets grotere diameter. Ze zijn uiterst geschikt voor korte, krachtige bewegingen en hebben de overhand in de bewegingsspieren. De ratio type 1/type 2 in een spier hangt af van verschillende factoren, in het bijzonder van de functie van de spier (graviditeit of beweging), het soort training (lange of korte afstanden) en de leeftijd van het dier (Cardinet, 1997). Deze 2 hoofdtypen worden verder onderverdeeld in subtypen, maar deze zijn van gering klinisch belang met uitzondering van het type 2M. Dit laatste komt enkel in de kauwspieren voor (Orvis en Cardinet, 1981). Ieder motoneuron bezuigt verscheidene spiervezels in verschillende bundels. Dit motoneuron bepaalt het spiertype. De distributie van de



Figuur 4. Spierbiopsie (gomoritrichoomkleuring Engel) A. Gezonde controlehond B. Eenjarige Labrador met ernstige "Hereditaire Labrador Retriever Myopathie": opvallende spiervezelgeneratie.



Figuur 5. Spierbiopsie (NADH-TR-kleuring pH 9,4) A. Gezonde controlehond B. Hond met neurogene atrofie van de type 2-spiervezels en milde hypertrofie van de type 1-spiervezels.

verschillende spiertypen verloopt bijgevolg volgens een mozaïekpatroon.

De pH-afhankelijke ATP-asekleuring is de standaardkleuring voor het onderscheid tussen de verschillende spiertypen. Aangezien de type 1-spiervezels veel mitochondriën en vetpartikels bevatten, tekenen ze zich ook duidelijker af bij mitochondriale enzymkleuringen, zoals het NADH-tetrazoliumreductase, het succinaatdehydrogenase of het cytochroom-C-oxidase en lipidkleuringen, zoals de Oil Red O- en de soedanzwartkleuring. De type 2-spiervezels bevatten veel glycogeen en worden gemerkt door de Periodic Acid Schiff (PAS)-kleuring.

Tijdens het enzymhistochemisch onderzoek let men op de spiervezeldiameter (atrofie of hypertrofie), de spiervezelvorm (rond of hoekig), de distributie van de verschillende spiervezeltypen (schaakbordpatroon of groepering) en het percentage van ieder spiervezeltype. Myopathieën worden gekenmerkt door een variatie in de spiervezeldiameter (bij chronische myopathieën wordt vaak een mengeling van atrofie en compensatoire hypertrofie vastgesteld),

door ronde atrofische spiervezels en door het behoud van het schaakbordpatroon (Figuur 4 A en B). Een onderscheid moet worden gemaakt met neurogene spieratrofie. Deze wordt eveneens getypeerd door een variatie in de spiervezeldiameter, maar de atrofische spiervezels hebben een eerder hoekige vorm en de mozaïekvorm gaat verloren bij chronische denervatie (Figuur 5 A en B). Een afwijkende type 1/type 2-verhouding wordt enkel bij welbepaalde myo- en neuropathieën waargenomen.

Vervolgens gaat men na of een abnormale opstapeling van cellen, te wijten aan een inflammatoir of tumoraal proces, aanwezig is. Infectieuze organismen kunnen worden aangetroffen in het spierbiopt maar zijn niet altijd van klinisch belang. Daarna wordt gelet op een eventuele abnormale celbouw: centrale 'cores', perifere staafjes of afbraakmateriaal van spierfibrillen respectievelijk waarneembaar bij 'central core', nemalinstaaftjes en myofibrillaire myopathie (Cooper *et al.*, 1986; Targett *et al.*, 1994; De-lauche *et al.*, 1998; Huxtable *et al.*, 1994; Shelton *et al.*, 2004). Eventuele opstapelings van materiaal in de spier-

cel, zoals mitochondriën, vet of glycogeen moeten onderzocht worden. Tenslotte worden ook afwijkingen ter hoogte van andere structuren dan de spiercel bekeken (bindweefsel, bloedvaten en zenuwen).

Ultrastructureel bestaat een spiercel naast de myofibrillen uit een spiercelmembraan of sarcolemma, een cytoplasma of sarcoplasma, mitochondriën en een endoplasmatisch of sarcoplasmatisch reticulum (Cullen en Landon, 1994). Iedere myofibril is opgebouwd uit een serie van sarcomeren. Het sarcomeer, beiderzijds afgesloten door een Z-schijf, is opgebouwd uit verschillende proteïnen die verantwoordelijk zijn voor de spiercontractie. De dunne actinefilamenten zitten vast op de Z-schijf en haken in de dikke myosinefilamenten. Deze overlappende filamenten zijn verantwoordelijk voor de dwarsstreping van de spiervezel tijdens licht- en elektronenmicroscopisch spieronderzoek. Door het verschil in elektronendensiteit kan men deze ultrastructureel verder opdelen in verschillende banden. De geleiding van de actiepotentiaal tot in het binnenste van de spiercel gebeurt door inwendige plooien van de spiercelmembraan, de transversale tubuli. Bij depolarisatie openen de calciumkanalen van het sarcoplasmatisch reticulum zich, waardoor calcium in het sarcoplasma wordt vrijgesteld (Gergely, 1994). Dit activeert het ineenschuiven van de actine- en myosinefilamenten en veroorzaakt een verkorting van de sarcomeren (Huxley, 1969). Na de contractie wordt het calcium weer in het sarcoplasmatisch reticulum gepompt. Ultrastructurele afwijkingen zullen onder de desbetreffende spierziekten worden besproken.

Dankzij het immunohistochemisch onderzoek kan de aan- of afwezigheid van bepaalde membraan- en cytoskeleteiwitten of 2M-antistoffen (Shelton en Cardinet, 1998) bij kauwspiermyositis worden nagegaan (Braund, 1991).

De moleculaire diagnose

Het DNA wordt uit enkele bloeddruuppels (EDTA-buisje) of een wangswab geëxtraheerd. Alvorens de mutatie aan te tonen, wordt het DNA ter hoogte van de gekende mutatie vermeerderd met behulp van PCR. Wegens het niet-invasief karakter en de accuraatheid van de moleculaire diagnose heeft men de neiging bij genetische spierziekten de vroegere biochemische testen en histochemische spierbiopsiekleuringen door de moleculaire diagnose te vervangen (Fyfe, 2002). Een DNA-test wordt echter telkens specifiek ontwikkeld voor één welbepaalde mutatie en dus vaak ook slechts voor één ras. Enkele testen zijn reeds commercieel beschikbaar (Giger *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1996; Honeyman *et al.*, 1999; Bhalerao *et al.*, 2002; Tired *et al.*, 2003).

BESLUIT

De diagnosestelling van een spierziekte is moeilijk. Daarom is een systematische en logische aanpak cruciaal, met als doel bepaalde oorzaken eerst uit te sluiten op de minst complexe en minst invasieve manier. Het diagnostisch plan bij de verdenking van een spierziekte bestaat uit een volledig klinisch-neurologisch onderzoek met een minimum aan te verzamelen data (hematologisch en biochemisch bloedonderzoek, urineanalyse en radiografisch thoraxonderzoek), gevolgd door het elektromyografisch onderzoek en ten slotte het onderzoek van het spierbiopt (Figuur 1). DNA-testen nemen wegens hun diagnostische accuraatheid en praktische voordelen een steeds belangrijker plaats in.

DANKWOORD

De auteurs zouden graag Dr. S. Blot (Dienst Neurologie, Afdeling Geneeskunde Kleine Huisdieren en Paarden, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort) bedanken voor het ter beschikking stellen van de elektromyografische figuur met myotone ontladingen (Figuur 3F).

LITERATUUR

- Aktas M., Auguste D., Lefebvre H.P., Toutain P.L. and Braun J.P. (1993). Creatine kinase in the dog: a review. *Veterinary Research Communications* 17, 353-369.
- Aktas M., Auguste D., Concordet D., Vinclair P., Lefebvre H., Toutain P.L., Braun J.P. (1994). Creatine kinase in dog plasma: preanalytical factors of variation, reference values and diagnostic significance. *Research in Veterinary Science* 56, 30-36.
- Aktas M., Lefebvre H.P., Toutain P.L., Braun J.P. (1995a). Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 18, 1-6.
- Aktas M., Vinclair P., Lefebvre H.P., Toutain P.L., Braun J.P. (1995b). In vivo quantification of muscle damage in dogs after intramuscular administration of drugs. *The British Veterinary Journal* 151, 189-196.
- Aktas B.M., Vinclair P., Autefage A., Lefebvre H.P., Toutain P.L., Braun J.P. (1997). In vivo quantification of muscle damage in dogs after general anaesthesia with halothane and propofol. *The Journal of Small Animal Practice* 38, 565-569.
- Amann J.F. (1998). Technique of skeletal muscle biopsy. In: Bojrab M.J., Bojrab J.M., Sloam B., Ellison G.W. (Eds.). *Current Techniques in Small Animal Surgery*, 4th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 91-94.
- Bhalerao D.P., Rajpurohit Y., Vite C.H., Giger U. (2002). Detection of a genetic mutation for myotonia congenita among Miniature Schnauzers and identification of a common carrier ancestor. *American Journal of Veterinary Research* 63, 1443-1447.

- Bieber L.L., Lewin L.M. (1981). Measurement of carnitine and O-acylcarnitines. *Methods in Enzymology* 72, 276-287.
- Bley T., Bilzer T., Neumann J., Jaggy A. (2001). Muskelbiopsien mit der Biopsiestanze - Entnahmetechnik, Versand und Beurteilungsfähigkeit. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 143, 405-409.
- Blot S. (2005). Disorders of the skeletal muscle - Canine. In: Ettinger S.J., Feldman E.C. (Eds.). *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat*, 6th edition, Elsevier, Missouri, p. 901-905.
- Bowen J.M. (1987). Electromyography. In: Oliver J., Hoerlein B., Mayhew I. (Eds.). *Veterinary Neurology*, Philadelphia, Saunders, p. 145-168.
- Braund K.G., Hoff E.J., Richardson E.Y. (1978). Histochemical identification of fiber types in canine skeletal muscle. *American Journal of Veterinary Research* 39, 561-565.
- Braund K.G., Lincoln C.E. (1981). Histochemical differentiation of fiber types in neonatal canine skeletal muscle. *American Journal of Veterinary Research* 42, 407-415.
- Braund K.G., McGuire J.A., Lincoln C.E. (1982). Observations on normal skeletal muscle of mature dogs: a cytochemical, histochemical, and morphometric study. *Veterinary Pathology* 19, 577-595.
- Braund K.G., Amling K.A. (1988). Muscle biopsy samples for histochemical processing: alterations induced by storage. *Veterinary Pathology* 25, 77-82.
- Braund K.G., Steiss J.E., Marshall A.E., Mehta J.R., Amling K.A. (1988). Morphologic and morphometric studies of the intrinsic laryngeal muscles in clinically normal adult dogs. *American Journal of Veterinary Research* 49, 2105-2110.
- Braund K.G. (1991). Nerve and Muscle Biopsy Techniques. *Progress in Veterinary Neurology* 2, 35-56.
- Braund K.G., Amling K.A., Mehta J.R., Steiss J.E., Scholz C. (1995). Histochemical and morphometric study of fiber types in ten skeletal muscles of healthy young adult cats. *American Journal of Veterinary Research* 56, 349-357.
- Braund K.G. (1997). Degenerative causes of myopathies in dogs and cats. *Veterinary Medicine* 92, 608-617.
- Brown N.O., Zaki F.A. (1979). Electrodiagnostic testing for evaluation of neuromuscular disorders in dogs and cats. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 174, 86-90.
- Cardinet G.H. (1997). Skeletal Muscle Function. In: Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. (Eds.). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th edition, Academic Press, San Diego, p. 407-440.
- Chanoit G.P., Concordet D., Lefebvre H.P., Orsel K., Braun J.P. (2002). Exercise does not induce major changes in plasma muscle enzymes, creatinine, glucose and total proteins concentrations in untrained beagle dogs. *Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 49, 222-224.
- Chrisman C.L., Burt J.K., Wood P.K., Johnson E.W. (1972). Electromyography in small animal clinical neurology. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 160, 311-318.
- Cooper B.J., De Lahunta A., Gallagher E.A., Valentine B.A. (1986). Nemaline myopathy of cats. *Muscle Nerve* 9, 618-625.
- Cuddon P.A. (2002). Electrophysiology in Neuromuscular Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 32, 31-62.
- Cunningham N.J. (1997). Neurophysiology. In: Cunningham N.J. (Ed). *Textbook of Veterinary Physiology*, Saunders, London, p. 36-43.
- Dawson D.M., Eppenberger H.M., Kaplan N.O. (1965). Creatine kinase: evidence for a dimeric structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21, 346-353.
- Delauche A.J., Cuddon P.A., Podell M., Devoe K., Powell H.C., Shelton G.D. (1998). Nemaline Rods in Canine Myopathies: 4 Case Reports and Literature Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 424-430.
- Dickinson P.J., LeCouteur R.A. (2002). Muscle and nerve biopsy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 32, 63-102.
- Fascetti A.J., Mauldin G.E., Mauldin G.N. (1997). Correlation between serum creatine kinase activities and anorexia in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 9-13.
- Fayolle P., Lefebvre H., Braun J.P. (1992). Effects of incorrect venepuncture on plasma creatine-kinase activity in dog and horse. *The British Veterinary Journal* 148, 161-162.
- Fyfe J.C. (2002). Molecular Diagnosis of Inherited Neuromuscular Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 32, 287-300.
- Gaschen F., Jaggy A., Jones B. (2004). Congenital diseases of feline muscle and neuromuscular junction. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 6, 355-366.
- Gergely J. (1994). Biochemical aspects of muscular structure and function. In: Walton J, Karpati G, Hilton-Jones D. (Eds.). *Disorders of Voluntary Muscle*, 6th Ed., Churchill Livingstone, London, p. 179-230.
- Giger U., Smith B.F., Woods C.B., Patterson D.F., Stedman H. (1992). Inherited phosphofructokinase deficiency in an American Cocker Spaniel. *Journal of American Veterinary Medical Association* 201, 1569-1571.
- Glass E.N., Kent M. (2002). The clinical examination for neuromuscular disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 32, 1-29.
- Hanson S.M., Smith M.O., Walker T.L., Shelton G.D. (1998). Juvenile-Onset Distal Myopathy in Rottweiler Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12, 103-108.
- Hoffmann G., Aramaki S., Blum-Hoffmann E., Nyhan W.L., Sweetman L. (1989). Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Clinical Chemistry* 35, 587-595.
- Holmgren N., Valberg S. (1992). Measurement of serum myoglobin concentrations in horses by immunodiffusion. *American Journal of Veterinary Research* 53, 957-960.
- Honeyman K., Carville K.S., Howell J.M., Fletcher S., Wilton S.D. (1999). Development of a snapback method of single-strand conformation polymorphism analysis for genotyping Golden Retrievers for the X-linked muscular dystrophy allele. *American Journal of Veterinary Research* 60, 734-737.
- Huxley H.E. (1969). The mechanism of muscular contraction. *Science* 164, 1356-1365.

- Huxtable C.R., Chadwick B., Eger C., Shaw S. (1994). Severe Subacute Progressive Myopathy in a Young Silky Terrier. *Progress in Veterinary Neurology* 5, 21-27.
- Cullen M.J., Landon D.N. (1994). Motor unit ultrastructure. In: Walton J., Karpati G., Hilton-Jones D. (Eds.). *Disorders of Voluntary Muscle*. 6th ed., Churchill Livingstone, London, p. 37-137.
- Kuzon W.M., Rosenblatt J.D., Pynn B.R., Marchetti P.J., Plyley M.J., McKee N.H. (1989). A comparative histochemical and morphometric study of canine skeletal muscle. *Canine Journal of Veterinary Research* 53, 125-132.
- Levy J.K., Crawford P.C., Werner L.L. (2006). Effect of age on reference intervals of serum biochemical values in kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228, 1033-1037.
- Matwchuk C.L., Taylor S.M., Shmon C.L., Kass P.H., Shelton G.D. (1999). Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. *American Journal of Veterinary Research* 60, 88-92.
- Moore S., Spackman D.H., Stein W.H. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Federation Proceedings* 17, 1107-1115.
- Neumann S., Bilzer T., Haug B. (2002). Klinik, Diagnose und Verlauf einer Muskeldystrophy beim Hund. *Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere* 30, 339-346.
- Orvis J.S., Cardinet G.H. (1981). Canine muscle fiber types and susceptibility of masticatory muscles to myositis. *Muscle Nerve* 4, 354-359.
- Platt S.R., Garosi L.S. (2004). Neuromuscular weakness and collapse. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34, 1281-1305.
- Reynolds A.J., Fuhrer L., Valentine B.A., Kallfelz F.A. (1995). New approach to percutaneous muscle biopsy in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 56, 982-985.
- Shelton G.D., Cardinet G.H. 3rd, Bandman E., Cuddon P. (1985). Fiber type-specific autoantibodies in a dog with eosinophilic myositis. *Muscle Nerve* 8, 783-790.
- Shelton G.D., Cardinet G.H. (1998). Canine Masticatory Muscle Disorders. In: Kirk R.W. (Ed.). *Current Veterinary Therapy X*, W.B. Saunders, Philadelphia, p. 816-819.
- Shelton G.D., Nyhan W.L., Kass P.H., Barshop B.A., Haas R.H. (1998). Analysis of organic acids, amino acids, and carnitine in dogs with lipid storage myopathy. *Muscle Nerve* 21, 1202-1205.
- Shelton G.D. (2004). Rhabdomyolysis, myoglobinuria, and necrotizing myopathies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34, 1469-1482.
- Shelton G.D., Sammut V., Homma S., Takayama S., Mizisin A.P. (2004). Myofibrillar myopathy with desmin accumulation in a young Australian Shepherd dog. *Neuromuscular Disorders* 14, 399-404.
- Sims M.H. (1983). Electrodiagnostic techniques in the evaluation of diseases affecting skeletal muscle. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 13, 145-162.
- Smith B.F., Stedman H., Rajpurohit Y., Henthorn P.S., Wolfe J.H., Patterson D.F., Giger U. (1996). Molecular Basis of Canine Muscle Type Phosphofructokinase Deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 20070-20074.
- Strain G.M., Kerwin S.C., Tedford B.L., Johnson R.P. (1998). Creatine Kinase Level Changes Following Electromyography in the Normal Anaesthetized Dog. *The Veterinary Journal* 156, 231-233.
- Targett M.P., Franklin R.J.M., Olby N.J., Dyce J., Anderson J.R., Houlton J.E.F. (1994). Central core myopathy in a great dane. *Journal of Small Animal Practice* 35, 100-103.
- Tiret L., Blot S., Kessler J.L., Gaillot H., Breen M., Panthier J.J. (2003). The *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Human Genetics* 113, 297-306.
- Valentine B.A., Blue J.T., Shelley S.M., Cooper B.J. (1990). Increased serum alanine aminotransferase activity associated with muscle necrosis in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4, 140-143.