

Aus dem Department für Pathobiologie, Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin¹ und aus dem Klinischen Department für Kleintiere und Pferde, Klinik für Interne Medizin und Seuchenlehre² sowie Abteilung für Bildgebende Diagnostik³, der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Ein Fall von Coccidioidomykose bei einem Hund in Österreich

B. REBEL-BAUDER¹, F. KÜNZEL², M. C. SCHWEDA², J. HASSAN³, R. HIRT² und A. URL¹

eingelangt am 10.6.2009
angenommen am 14.8.2009

Schlüsselwörter: Coccidioidomykose, *Coccidioides immitis*, Pilz, Hund, in situ Hybridisierung, Österreich, Reiseanamnese.

Zusammenfassung

Ein 4jähriger Mischlingsrüde wurde wegen therapieresistenten Hustens und Fiebers sowie einer intermittierend auftretenden Lahmheit der rechten Vorderextremität an der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorgestellt. Die Erhebung der Reiseanamnese des Hundes ergab wiederholte Aufenthalte in Kalifornien. Im Rahmen der diagnostischen Aufarbeitung verstarb der Hund, und die Lunge wurde zur endgültigen diagnostischen Abklärung an das Institut für Pathologie übermittelt. Die pathohistologische Untersuchung und in situ Hybridisierung (ISH) ergaben eine durch Infektion mit *Coccidioides immitis*, einem in Österreich nicht endemischen Schlauchpilz, verursachte pyogranulomatöse Pneumonie. Im Hinblick auf die immer größer werdende Mobilität von Besitzern und ihren Hunden, ist auch in Österreich mit „neuen“ Infektionserregern zu rechnen, wodurch der Ermittlung einer fundierten Reiseanamnese größere Bedeutung zukommt.

Keywords: coccidioidomycosis, *Coccidioides immitis*, fungi, dog, in situ hybridization, Austria, travelling-anamnesis.

Summary

A case of coccidioidomycosis of a dog in Austria

Introduction

Coccidioides immitis is a dimorphic fungus endemic in arid climates of Northern and Southern America causing coccidioidomycosis (Valley Fever, Desert Fever or Desert Rheumatism) in man and several animal species, including dogs. After aerogenous infection by inhaling arthrospores they disperse along the bronchial tree into the alveoli where they are phagocytosed. The arthrospores experience structural changes into spherules, undergo endospore formation and release thousands of endospores in the surrounding tissue. Infection usually remains localized in the lungs and in the hilar lymph nodes, but sometimes the infection generalizes into bones, joints, lymph nodes and skin.

Case report

A cross-breed dog aged 4 years was referred to the University of Veterinary Medicine Vienna with a history of persistent cough, fever and intermittent lameness of the right front limb. The dog was presented with history of repeated visits in California. The dog died during diagnostic work-up and the lung was sent to the Institute of Pathology for further examinations.

Material and methods

For pathohistologic diagnosis and representation of the fungi, HE (Haematoxylin and Eosin)-, GMS (Grocott's Methenamin Silver)-, PAS (Periodic Acid Schiff)-, and Gram-staining was performed on formaldehyde-fixed, paraffin-embedded sections of the lung. Species-specific characterization of the fungi was done by ISH (in situ hybridization) using oligonucleotide probes designed for identification of *Coccidioides immitis* and *Blastocystis dermatitidis* by HAYDEN et al. (2001).

Results

Pathohistologic diagnosis and ISH revealed a pyogranulomatous infection of the lungs caused by *Coccidioides immitis*, a member of sac fungi not endemic in Austria.

Conclusion

On account of the increasing mobility of owners and their dogs, foreign infectious agents may occur in Austria bringing into focus the importance of meaningful travelling anamnesis surveillance.

Abkürzungen: AGID = Agar Gel Immunodiffusion; ELISA = Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FNA = ultraschallgeführte Feinnadelaspiration; HE = Hämatotoxylin & Eosin; GMS = Grocott's Methenamin Silber; ISH = in situ Hybridisierung; PAS = Periodic Acid Schiff; SSC = saline sodium citrate; BCIP = 5'-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate; NBT = Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid

Einleitung

Coccidioides immitis ist ein endemisch im Boden trockener Landstriche Nord- und Südamerikas vorkommender Pilz, der beim Menschen und verschiedenen Tierarten als Erreger der Coccidioidomykose (auch Talfeber, Wüstenfieber oder Wüstenrheumatismus) gilt. Endemiegebiete sind der Südwesten der USA mit Teilen von Neu Mexiko, Texas, das Central Valley von Kalifornien, der Süden von Arizona, Nevada und Utah, der Norden von Mexiko sowie einige Infektionsherde in Zentralamerika und Argentinien (ANONYMUS, 2004; GRAUPMANN-KUZMA et al., 2008). Als Vertreter der Familie der Onygenaceae gehört *Coccidioides* systematisch der großen Abteilung der Schlauchpilze (Ascomycota) an (Tab.1).

Im Boden oder auch im Kulturmedium wächst *Coccidioides* als Mycel, das aus septierten, hyalinen Hyphen von 2-4 µm Durchmesser besteht. Die meisten Isolate produzieren durch engere Septierung rechteckige oder fassförmige Arthrokonidien, die sich charakteristischerweise mit kleineren, nicht lebensfähigen, brüchigen Zellen abwechseln (GREENE, 1998). Durch die Degeneration der brüchigen Zellen werden die infektiösen Arthrosporen in den umgebenden Boden entlassen. Perioden mit heftigen Regenfällen nach der Trockenzeit führen zum Wachstum der Mycelien, die die Bodenoberfläche erreichen, an der es zur Reifung der Arthrosporen kommt.

Die Infektion erfolgt aerogen durch Inhalation von Arthrokonidien (Arthrosporen) - jene verteilen sich entlang des Bronchialbaums bis in die Lungenalveolen, wo sie phagozytiert werden und durch den erhöhten CO₂-Gehalt eine strukturelle Umwandlung zu sogenannten Sphärulen - dickwandigen, rundlichen Strukturen von 20-200 µm Größe - durchmachen. Die Sphärulen vergrößern sich und bilden in ihrem Inneren zahlreiche Endosporen (2-5 µm im Durchmesser) aus, die nach Ruptur der Sphärulenhaut in das umgebende Gewebe freigesetzt werden und auf diese Weise hochgradige, lokale und eitrige Reaktionen induzieren. Im Zuge der Entwicklung zu reifen Endosporen werden die umgebenden neutrophilen Granulozyten durch Lymphozyten, Plasmazellen, Epitheloidzellen und Fremdkörperriesenzellen ersetzt. Die ausgereifte, vergrößerte Sphärule kann von Epitheloidzellen und vielkernigen Riesenzellen umgeben sein. Bei Ruptur der Sphärule und Freisetzung der Endosporen beginnt der inflammatorische Zyklus erneut, und es kommt zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten ins Zentrum des Granuloms. Im histologischen Schnitt findet man Sphärulen unterschiedlichen Reifegrades, weil der gesamte Reproduktionszyklus von *Coccidioides* im Gewebe in nur wenigen Tagen durchlaufen wird. Somit finden sich auch akute und chronisch-granulomatöse Entzündung in unmittelbarer Nachbarschaft (CHANDLER et al., 1980). Durch das Heranwachsen der Endosporen zu neuen Sphärulen nimmt der Entwicklungszyklus von *Coccidioides immitis* solange seinen Lauf, bis der Wirtsorganismus die Infektion durch Aktivierung der zellulären und der humoralen Immunabwehr unter Kontrolle gebracht hat (STEVENS, 1995; COX u. MAGEE, 2004). Die Ausbildung eines Primärherdes in der Lunge kann entweder klinisch inapparent verlaufen oder sich als respiratorischer Infekt unterschiedlichen Schweregrades manifestieren. Seltener werden Arthrospo-

ren direkt in verletzte Hautareale inokuliert und verursachen so eine primäre, kutane Infektion (KIRKLAND u. FIERER, 1996). Speziell bei immunsupprimierten Individuen ist eine Ausbreitung des Infekts via lympho- bzw. hämatogenem Transportweg auch in andere Organsysteme wie Knochen, Gelenke, Meningen, Weichteile und Haut möglich. Bei Hunden, die für *Coccidioides immitis* ähnlich empfänglich sind wie der Mensch (SHUBITZ, 2007), äußert sich die Infektion meist als Husten mit Pneumonie-ähnlichen Symptomen, oft verbunden mit Fieber, Appetitverlust und Abnahme der Körpermasse. Hunde mit der disseminierten Form zeigen häufig zusätzlich Anzeichen von Lahmheit, geschwollene Lymphknoten und nässende Hautläsionen, die sich über infizierten Knochenstellen bilden können. Die Krankheit kann chronisch werden, und unbehandelt führt die disseminierte Form zum Tod. Eine Übertragung der Coccidioidomykose von Mensch zu Mensch, Tier zu Tier oder auch Tier zu Mensch ist nicht nachgewiesen (STEVENS, 1995).

Die Inkubationszeit variiert von 7 bis zu 21 Tagen, im Fall der chronischen pulmonalen Coccidioidomykose kann sich die Krankheit bis zu 20 Jahre nach einer unerkannt gebliebenen Primärinfektion entwickeln (ANONYMUS, 2004).

Die Diagnose resultiert beim lebenden Tier aus einer Kombination von Anamnese, klinischen und röntgenologischen Befunden, Identifizierung des Pilzes aus Biopaten und dem Nachweis von zirkulierenden Antikörpern gegen *Coccidioides* im Serum (SHUBITZ u. DIAL, 2005). Radiologisch lassen sich Veränderungen in den Organen nachweisen, aber die Befunde sind nicht pathognomonisch für Coccidioidomykose. Ein deutlicher Hinweis auf die Infektion ist bei Hunden eine hiläre Lymphadenomegalie, die manchmal auch ohne oder nur mit minimalen Veränderungen in den Lungen einhergeht. Oft kann ein diffuses, interstitielles Muster an Verschattungen der Lunge, am meisten in den hilären und zentralen Regionen, radiologisch dargestellt werden (BRUNNBERG et al., 1993). In manchen Fällen zeigen sich Knoten, Konsolidierung eines oder mehrerer Lungenlappen(s), eine pleurale Effusion, eine granulomatöse Pneumonie und eine sternale Lymphadenomegalie (MILLMAN et al., 1979; WOHLSEIN et al., 1993; JOHNSON et al., 2003). Charakteristische radiologisch nachweisbare Veränderungen in den Knochen sind lytische und proliferative Läsionen mit periostalen Knochenzubildungen.

Hunde mit Coccidioidomykose weisen im Blutbild oft eine Monozytose mit/ohne moderate(r) Neutrophilie auf, eine geringe Hyperproteinämie sowie eine Hyperglobulinämie. Der Nachweis von spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) oder AGID (Agar Gel Immunodiffusion) ist möglich, allerdings scheint es keine Korrelation zwischen dem Antikörpertiter und dem Schwere- bzw. Ausbreitungsgrad der Coccidioidomykose zu geben: Hunde mit einem niedrigen Titer wie 1:2 können krank sein, und subklinisch infizierte Hunde können einen Titer von 1:16 aufweisen. Eine generelle Richtlinie besagt, dass ein kranker Hund mit einem IgG-Titer von 1:16 wahrscheinlich an einer klinisch relevanten Coccidioidomykose leidet (SHUBITZ et al., 2005; JOHNSON et al., 2003).

Die histologische Diagnose der Coccidioidomykose erfolgt durch den Nachweis der Sphärulen (20-200 µm),

die in verschiedenen Entwicklungsstadien im selben Schnitt zu sehen sein können - einerseits kleine, am Anfang des Reifungsprozesses stehende Sphärulen, andererseits reife Sphärulen mit Endsporen, aber auch kollabierte Sphärulen ohne Endsporen. In der HE-(Hämatoxylin/Eosin-)Routinefärbung stellen sich sowohl die Endsporen als auch die Zellwand der Sphärulen stark basophil dar. Spezialfärbungen wie PAS (Periodic Acid Schiff) und GMS (Grocotts Methenamin Silber) vergrößern den Kontrast zwischen den Pilzen und dem umgebenden Gewebe - mit PAS werden die Endsporen gefärbt, die Sphärulwand hingegen nicht, mit GMS können beide Strukturen dargestellt werden (CHANDLER et al., 1980). Immunhistologisch können das von den Sphärulen eingeschlossene Material und die Endsporen durch den Einsatz von *Coccidioides immitis*-spezifischen Antikörpern markiert werden (WOHLSEIN et al., 1993). Molekularbiologisch können die Sphärulen sowie die Endsporen durch eine in situ Hybridisierung unter der Verwendung von *Coccidioides*-spezifischen Oligonukleotidsonden nachgewiesen werden (HAYDEN et al., 2001).

Fallbericht

Der 4jährige Mischlingsrüde wurde mit der Anamnese von therapieresistentem Husten (seit 6 Wochen) und Fieber (seit 5 Wochen) im Tierspital der Veterinärmedizinischen Universität Wien vorgestellt. Der ursprünglich aus Sizilien stammende Rüde lebte aufgrund eines Zweitwohnsitzes der Besitzerin zum Teil im südlichen Kalifornien und zum Teil in Österreich. Im Vorbericht wurde außerdem eine seit ca. 2 Monaten intermittierend auftretende Lahmheit der rechten Vorderextremität, die etwa einen Monat nach einer Bissverletzung im Bereich des rechten Ellbogens bzw. des Thorax beobachtet wurde, festgehalten. Eine in Kalifornien durchgeführte diagnostische Abklärung führte zur Verdachtsdiagnose einer pyogranulomatösen Entzündung der Lunge mit fraglich positivem *Coccidioides*-Antikörpertiter. Es konnten weder eine eindeutige Ursache dieses inflammatorischen Prozesses, noch ein Grund für die phasenweise auftretende Lahmheit ermittelt werden. Ein zweimaliger in den USA durchgeführter antibiotischer Therapieversuch (Enrofloxacin; Amoxicillin/Clavulansäure jeweils 10 Tage lang) sowie eine orale Behandlung mit Fluconazol über 4 Tage führten jedoch zu keiner Verbesserung des klinischen Zustandes.

Im Rahmen der Erstuntersuchung an der Veterinärmedizinischen Universität Wien wurden im Zuge der Auskultation hochgradig verschärft vesikuläre bzw. bronchiale Atemgeräusche festgestellt. Sonst verlief die klinische Untersuchung unauffällig. Die hämatologische Blutuntersuchung ergab eine moderate Leukozytose ohne Linksverschiebung (28.770/ μ l; Referenzwert 6.000 - 15.000/ μ l) sowie eine Monozytose (2.589/ μ l; Referenzwert < 500/ μ l). Die parasitologische Kotuntersuchung (Flotation, Auswanderungsverfahren) verlief negativ.

Material und Methode

Bildgebende Diagnostik und Zytologie

Die Röntgenaufnahmen des Thorax zeigten einen geringgradigen Liquidothorax, eine vermehrt bronchointer-

stitielle Lungenzeichnung sowie eine Verdichtung dorsal der Herzbasis, die als mögliche Lymphknotenvergrößerung interpretiert wurde.

Die Ultraschalluntersuchung des Abdomens und des Herzens war unauffällig. Im Thorax waren dorsal des Herzens vergrößerte echoarme Lymphknoten sichtbar. Des Weiteren wurde eine Thorakozentese sowie eine ultraschallgeführte Feinnadelaspiration (FNA) von Gebilden unterschiedlicher Echogenität an der Lungenoberfläche bzw. im Pleuralraum durchgeführt.

Die Untersuchung der durch Thorakozentese gewonnenen Pleuraflüssigkeit ergab ein Exsudat bestehend aus > 95 % nicht degenerierten neutrophilen Granulozyten und vereinzelt mononukleären Zellen (größtenteils aktivierten Makrophagen). Auch die ultraschallgeführte Feinnadelaspiration (FNA) der Lunge lieferte Hinweise auf eine pyogranulomatöse Entzündung ohne erkennbare Ursache. Die bakteriologische Untersuchung des Punktats ergab multiresistente *E. coli*; mykologische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

In der Computertomographie wurden geringe bis mittlere Mengen freier Flüssigkeit im Thorax dargestellt. Vorwiegend in der rechten Thoraxhälfte fanden sich solide Verdichtungen (Abb. 1), die teilweise mit der Thoraxwand verbunden waren. Die Wände der Hauptbronchien stellten sich prominent dar, und im rechten Stammbronchus war eine knotige Zubildung sichtbar. Die regionären Lymphknoten waren vergrößert.

Zur makroskopischen Beurteilung der Atemwege und Durchführung einer bronchoalveolären Lavage erfolgte eine Bronchoskopie. Folgendes Anästhesieregime wurde angewendet: Präoxygenierung mit 100 % Sauerstoff über 3 Minuten; danach wurde eine Prämedikation mit 0,2 mg/kg Butorphanol (Butdomidor®) und 0,2 mg/kg Midazolam (Midazolam®), darauffolgend eine Einleitung mit 4 mg/kg Propofol (Propofol®) und die Narkoseerhaltung mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch. Dabei stellte sich der Larynx morphologisch und funktionell ohne Besonderheiten dar. Die Trachea wies eine mittelgradig verstärkte Gefäßinjektion auf und eine hochgradige Stumpfandigkeit im Bereich des Überganges zur Bifurkation. Im rechten Stammbronchus wurden mehrere miliare, in das Lumen protrudierende Knötchen dargestellt, von denen Biopsieproben für die histologische Untersuchung entnommen wurden. Das Lumen des rechten Kraniallappenbronchus war durch eine massive Schleimhautschwellung fast vollständig obliteriert, während der rechte Mittel- und Kaudallappenbronchus, sowie der Bronchialbaum bis auf eine geringgradige Schleimhautrötung weitgehend unauffällig waren.

Während die unmittelbare postanästhetische Aufwachphase ohne Komplikationen verlief, entwickelte der Patient nach etwa einer Stunde Schnappatmung und verstarb trotz Reanimationsbemühungen.

Mehrere Teile der Lunge wurden zur pathohistologischen Untersuchung an das Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin übermittelt.

Pathohistologische Untersuchung

Von den formaldehydfixierten, paraffineingebetteten Lungenproben wurden 3 μ m dicke Schnitte angefertigt und routinemäßig mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt; weiters wurden die Schnitte mittels PAS (Periodic Acid Schiff-Reakti-

on), Methenamin-Silber-Lösung nach Grocott (GMS) sowie nach Ziehl-Neelsen und Gram gefärbt.

In situ Hybridisierung (ISH)

Zum Nachweis bzw. zur Unterscheidung von *Coccidioides immitis*- und *Blastomyces dermatitidis*-spezifischer ribosomaler RNA wurden Digoxigenin-markierte Oligonukleotidsonden verwendet (Tab. 2; HAYDEN et al., 2001). Die verwendeten Sonden wiesen keine Kreuzreaktionen der Basensequenzen mit jenen von Bakterien, Parasiten, Tieren oder dem Menschen auf.

3 µm dicke Paraffinschnitte wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen, in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach Permeabilisierung des Gewebes und Freilegung der DNA durch 30minütige Inkubation in einer Proteinase K-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei 37 °C wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült, kurz in 95 %iges Ethanol getaucht, für 5 Minuten in 100 %igen Alkohol gestellt und luftgetrocknet. Die Stammlösung der synthetisch hergestellten Oligonukleotidsonden (Konzentration 1 µg/µl) wurde auf eine Endkonzentration von 2 ng/µl im Hybridisierungspuffer eingestellt.

2 µl Sonde, 5 µl Heringssperma-DNA (Invitrogen, Lofer, Österreich) und 7 µl deionisiertes Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurden gemischt, bei 95 °C für 5 Minuten hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu dieser Lösung wurde dann der Hybridisierungsmix, bestehend aus 43 µl Formamid, 20 µl 20x SSC (Saline Sodium Citrate), 2 µl Denhardt/Lösung (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland), 10 µl Dextransulfat (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) und 11 µl Aqua dest. hinzugefügt. Die Schnitte wurden mit der resultierenden Hybridisierungslösung bedeckt, für 6 Minuten bei 95 °C erhitzt und danach auf Eis schockgekühlt. Nach Inkubation der Schnitte bei 40 °C im Brutschrank über Nacht wurden die Schnitte am nächsten Tag in SSC gewaschen. Die entstandenen Hybride wurden mit einem gegen Digoxigenin gerichteten und mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörper (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gekoppelt und durch anschließende Inkubation mit einer BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid)-Substratlösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) sichtbar gemacht. Nach Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

Ergebnisse

Pathohistologische Untersuchung

Die Trachealbiopsie aus dem Bereich der Bifurkation war aufgrund der durch die Entnahmeprozedur stark veränderten Zellen nur bedingt auswertbar. Das Epithel erschien teilweise ballonierend degeneriert und von neutrophilen Granulozyten und Streptokokken durchsetzt. Weiters fanden sich für junges Granulationsgewebe charakteristische kleinere, neugebildete Blutgefäße sowie Plasmazellen, Histiozyten und Fibroblasten. Aus den oben angeführten Befunden ergab sich kein Hinweis auf eine Neoplasie sondern auf eine pyogranulomatöse Entzündung, in der auch in der Ziehl-Neelsen-Färbung kein Hinweis auf die Ursache der Entzündung gefunden

werden konnte; die in der HE-Färbung nachgewiesenen Streptokokken wurden im Sinne einer Sekundärinfektion interpretiert.

Histologisch präsentierte die Lunge eine hochgradige pyogranulomatöse Pneumonie mit epitheloiden Makrophagenherden sowie großflächigen, verkäsenden Nekrosen im Zentrum der Granulome (Abb. 2a). Kugelige Pilzelemente, die in ihrer Form an Blasto- oder Coccidioidomyceeten erinnerten, fanden sich vor allem im Bereich der Nekrosen (Abb. 2b). Außerhalb der mykotischen Entzündungsareale wurde disseminiert ein hochgradiger Desquamativkatarrh sowie eine mäßige lymphozytäre interstitielle Entzündung - teilweise auch subserös mit deutlicher Mesothelaktivierung - festgestellt.

Sphärulen waren in unterschiedlichen Reifestadien im Schnitt zu erkennen. Ihre Größe variierte zwischen 12 und 70 µm. In den Granulomzentren waren nur vereinzelt freigesetzte Sporen vorhanden. Als Ausdruck einer lokalen Antigen-Antikörperreaktion waren einige Sphärulen von Splendore-Hoepli-verdächtigen, eosinophilen Formationen umgeben.

Sowohl die Sphärulen als auch die Endosporen von *Coccidioides immitis* konnten in der GMS-Färbung gut und deutlich schwarz gefärbt dargestellt werden (Abb. 2c). In der PAS-Reaktion zeigte sich kein einheitliches Färbemuster. Die Wände leerer Sphärulen reagierten mehrheitlich PAS-negativ, gefüllte Sphärulen zeigten teilweise ein stark PAS-positives Zytoplasma, manchmal aber auch eine rosafarbene Hülle (Abb. 2d, 2e). Die in den Sphärulen befindlichen Endosporen reagierten mehrheitlich positiv (rosafarben). In der Gram-Färbung zeigten beide Strukturen keinerlei Anfärbung.

In situ Hybridisierung

Mit der gegen *Coccidioides immitis* hergestellten Sonde wurden positive Signale erzielt - Sphärulen mit Endosporen sowie phagozytierte Endosporen waren blauschwarz gefärbt (Abb. 2f). Viele leere Sphärulen erschienen in der ISH ungefärbt. Die Wände der Endosporen zeigten ein deutlich positives Signal, das Sporennere war weniger stark gefärbt. Vereinzelt wurden in den nekrotischen Bereichen der Granulome auch volle, aber nahezu ungefärbte Sphärulen beobachtet. Im Gegensatz dazu erbrachte die ISH mit Verwendung der gegen *Blastocystis dermatitidis* generierten Oligonukleotidsonde durchwegs negative Resultate - keines der im Gewebe befindlichen Pilzelemente zeigte ein entsprechendes Farbsignal.

Diskussion

Außerhalb der Endemiegebiete sind Fälle von Coccidioidomykose bei Mensch und Tier sehr selten und als erworbene Infektionen bei Aufenthalt in den Endemiegebieten zu sehen (DESAI et al., 2001; GINO-MOOR et al., 2003). In Zentraleuropa wurden innerhalb der letzten Jahre einige wenige Fälle von humaner Coccidioidomykose nachgewiesen (BUIJZE et al., 2008; STAMM u. RAGAZ, 2008), für den Hund sind bis dato ebenfalls nur vereinzelte publizierte Fälle bekannt (NORDSTOGA et al., 1959; BRUNNBERG et al., 1993; WOHLSEIN et al., 1993). In dem von uns bearbeiteten Fall wurde die Infektion mit *Coccidioides immitis* sehr wahrscheinlich bei einem der Aufenthalte in Kalifornien erworben.

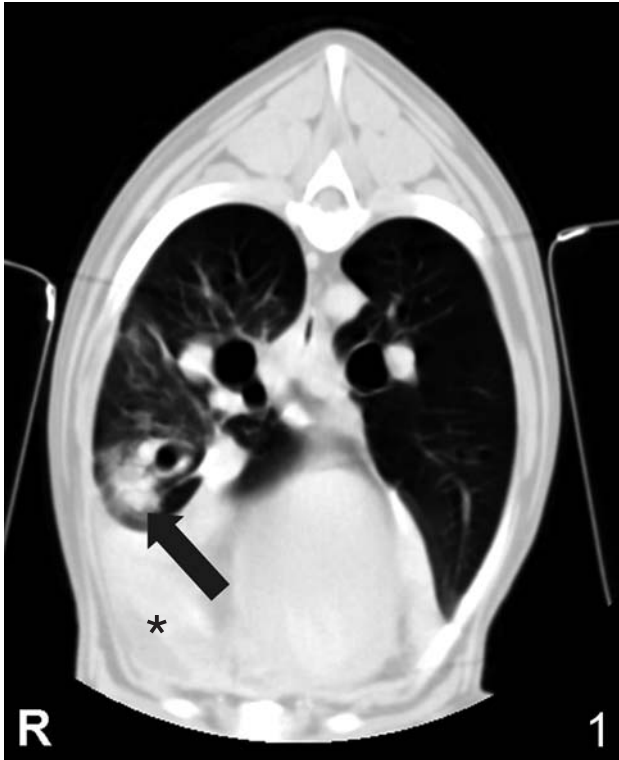


Abb. 1: Computertomographie, Transversalschnitt auf Höhe des kaudalen Herzens im Lungenfenster; der Pfeil markiert eine mit einem Bronchus assoziierte, unregelmäßige Verschattung im rechten Mittellappen der Lunge. Ventral der markierten Raumforderung stellt sich die Lungengrenze durch die Flüssigkeit im Pleuralraum (Stern) abgerundet dar. Die Lungentransparenz der rechten Lunge ist vermindert, die Lungenzeichnung ist vermehrt interstitiell.

Tab. 1: Systematische Stellung von *Coccidioides immitis*

Domäne	Eukaryota
Reich	Fungi
Abteilung	Ascomycota
Klasse	Euascomycetes
Ordnung	Onygenales
Familie	Onygenaceae
Gattung	<i>Coccidioides</i> (RIXFORD u. GILCHRIST, 1896)
Art	<i>Coccidioides immitis</i>

Tab. 2: Basensequenzen der zur ISH eingesetzten Oligonukleotidsonden

Name der Sonde	Genbank Nr.	Basensequenz (5' -> 3')	Ziel
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	M55624	GCA AAC GCG AGC CGG GCT	18S rRNA
<i>Coccidioides immitis</i>	M55627	GAA CGG GTT ATT CAA AGT TGC CCG T	18S rRNA

In Endemiegebieten haben junge Hunde (jünger als 6 Jahre) und große Rassen (mehr als 22 kg) genauso wie Hunde, die sich viel im Freien aufhalten, ein erhöhtes Risiko, an Coccidioidomykose zu erkranken. Häufig betroffene Rassen umfassen Boxer, Dobermann, Pointer, Australischer Schäferhunde und Schottische Terrier (DAVIDSON u. PAPPAGIANIS, 1994) - der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Hund fällt zumindest mit dem Alter (4 Jahre) in die Risikogruppe (BUTKIEWICZ et al., 2005).

Infektionen mit *Coccidioides* sp. verursachen bei Mensch und Tier ein heterogenes Krankheitsbild. Unter-

schieden werden die pulmonale, die disseminierte, die residual-pulmonale und die primäre kutane Coccidioidomykose. Alle Manifestationen ähneln sehr der durch *Blastomyces dermatitidis* verursachten disseminierten Blastomykose.

Im Rahmen der primären pulmonalen Coccidioidomykose zeigen sich relativ früh metastatische Läsionen in den peribronchialen und peritrachealen, den hilären sowie den mediastinalen Lymphknoten, von denen ausgehend es zur Weiterverbreitung der Infektion im Körper kommt und daraus die disseminierte Form entsteht. Über Arealen mit

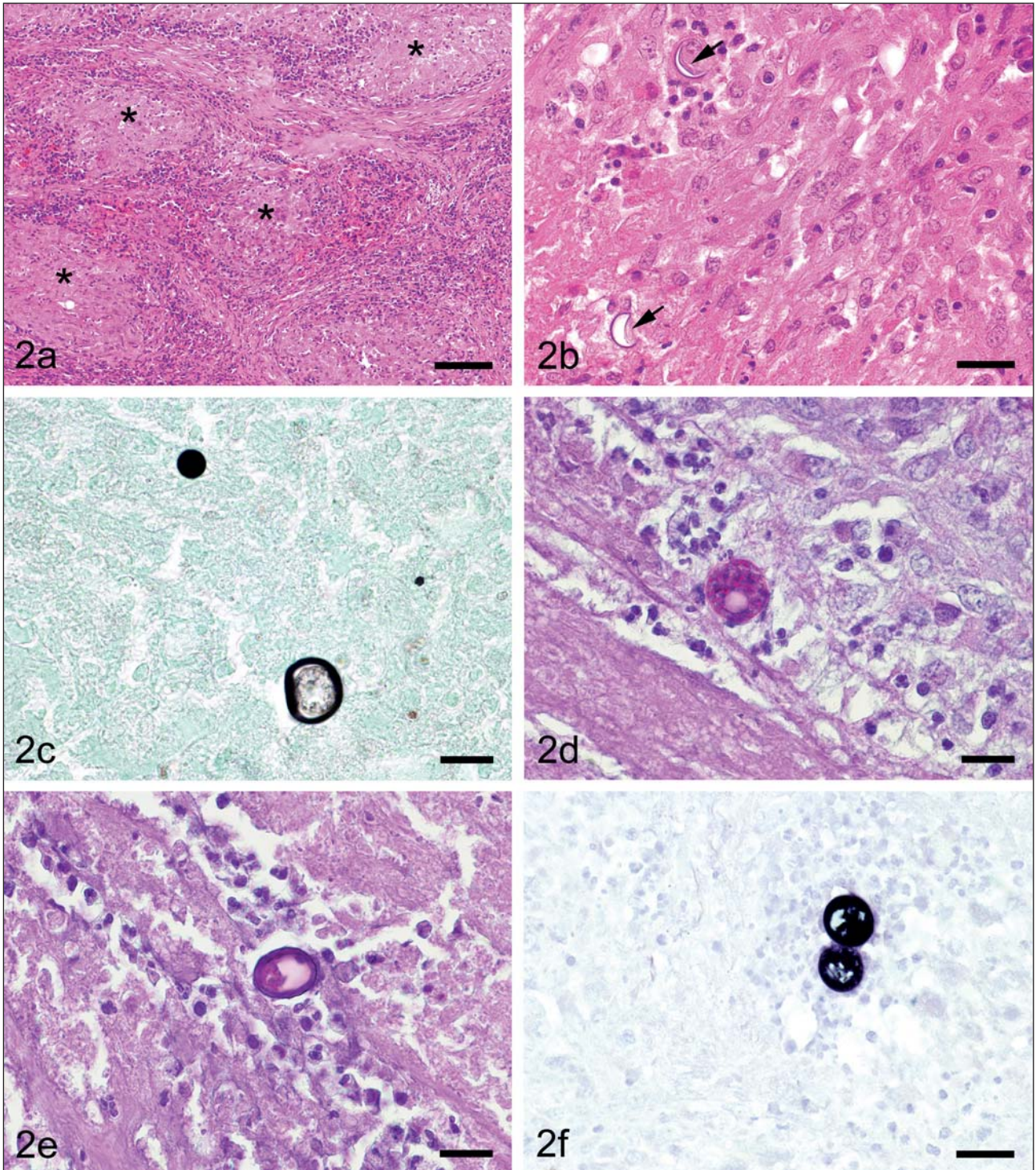


Abb. 2a: Lunge, chronische, pyogranulomatöse Pneumonie mit epitheloiden Makrophagen und zentralen Nekrosen (Sterne); HE-Färbung, Balken = 100 µm

Abb. 2b: Lunge, kollabierte Sphärulen im Entzündungsareal (Pfeile); HE-Färbung, Balken = 25 µm

Abb. 2c: Lunge, deutlich schwarz angefärbte Pilzelemente in der GMS-Färbung; Balken = 15 µm

Abb. 2d: Lunge, Endosporulation innerhalb einer reifenden Sphärule; PAS-Reaktion, Balken = 15 µm

Abb. 2e: Lunge, dickwandige Sphärule im Entzündungsherd; PAS-Reaktion; Balken = 15 µm

Abb. 2f: Lunge, positives Signal zweier Sphärulen in der in situ Hybridisierung; Balken = 25 µm

hochgradiger Pneumonie können auch eine fibrinöse oder granulomatöse Pleuritis bzw. pleurale Ergüsse auftreten (MILLMAN et al., 1979; JOHNSON et al., 2003), die bei dem Hund in der vorliegenden Publikation durch den röntgenologischen Nachweis von freier Flüssigkeit im Thorax und die pathohistologisch diagnostizierte Mesothelaktivierung ebenfalls beobachtet werden konnten. Die bei den bakteriologischen und zytologischen Untersuchungen des Pleuralpunktats und der Trachealbiopsie festgestellten Keime sind am ehesten im Sinne einer Sekundärinfektion zu interpretieren. Die beschriebenen Multiresistenzen von *E. coli* könnten auf die mehrmaligen antibiotischen Therapieversuche in den USA zurückzuführen sein.

Residuen der pulmonalen Coccidioidomykose sind solitäre oder multiple fibrös-verkäsende Granulome („Coccidioidome“), die von einer dünnen fibrösen Kapsel umgeben sind (CHANDLER et al., 1980). Die Läsionen können eine Ausdehnung von bis zu einigen Zentimetern erreichen und in ihrem Inneren weiterhin lebensfähige Agentien enthalten. Wenn sich die Immunkompetenz des Wirtes ändert, besteht die Möglichkeit, dass sich die ruhenden wieder zu aktiven Infektionsherden entwickeln. Selbst in alten Läsionen finden sich selten aber doch intakte Sphärulen mit Endosporen, häufiger aber fragmentierte oder leere Sphärulen. Fallweise finden sich auch Pilzhyphen in den Wänden der Lungenkavernen, selten in den verkäsenden Zentren der Granulome (CHANDLER et al., 1980). Bei Betrachtung der pathohistologischen Befunde der Lunge (siehe unten) sowie der beobachteten Lahmheit einer Vorderextremität könnte es sich beim hier beschriebenen Hund um einen Fall von disseminierter Coccidioidomykose handeln - leider war eine definitive Abklärung wegen der fehlenden Verfügbarkeit von Proben der Haut, Knochen oder Lymphknoten nicht mehr möglich. Eine endoskopische Entnahme einer Gewebeprobe und die darauf folgende pathohistologische Untersuchung können aufgrund der durch die Entnahmeprozedur vielfach veränderten Zellen nur bedingt zur Diagnosestellung beitragen. Auch zytologische Befunde von Proben aus Bronchoalveolarlavenagen sind in der Regel negativ.

Die primäre kutane Coccidioidomykose ist selten und entsteht durch die direkte Inokulation des Pilzes in die Haut. Wesentlich häufiger sind die kutanen Läsionen allerdings eine Folge der hämatogenen Dissemination von *Coccidioides immitis*. Typischerweise entsteht hier eine gemischte purulente und granulomatöse Reaktion in Dermis und Subkutis, die oft mit einer Hyperplasie der darüber liegenden Epidermis assoziiert ist.

Die unterschiedliche Ausprägung der Entzündung ist von der Form der Krankheit abhängig und davon, welches Stadium (oder welcher Teil) des Pilzes in direktem Kontakt mit dem Wirtsgewebe steht. Auch die Immunantwort des Wirts spielt für die Ausprägung der Art und des Schweregrades der Entzündung eine Rolle - bei Individuen mit schnell fortschreitender Krankheit dominiert die eitrige Entzündung, bei Menschen oder Tieren mit gutem Ansprechen der Immunabwehr herrscht eher die Bildung von Granulomen mit anschließender Fibrose, Vernarbung und fallweise Kalzifizierung vor (WILSON, 1962; CASTELOT et al., 1960). In den Lungenschnitten des in dieser Arbeit vorgestellten Hundes wurden die für die Coccidioidomykose typischen T_H1 -Granulome mit dem charakteristischen Aufbau aus zentraler Nekrose, umgebendem Bereich aus

Makrophagen und Epitheloidzellen sowie einem umschließenden Ring aus Lymphozyten, beobachtet (ACKERMANN, 2009). Es konnten Sphärulen unterschiedlicher Reifungsgrade (und damit unterschiedlicher Größe) nachgewiesen werden, die für eine bereits länger andauernde Infektion sprechen.

Nach wie vor werden in der pathohistologischen Diagnostik von Pilzinfektionen konventionelle Färbemethoden wie die *GMS-Färbung* eingesetzt. Allerdings zeigten Studien, dass speziell Infektionen mit *Coccidioides immitis* inkorrekt diagnostiziert wurden, was besonders auf die morphologische Heterogenität der unterschiedlichen Entwicklungsstadien zurückzuführen sein dürfte (HAYDEN et al., 2001).

Da leere Sphärulen von *Coccidioides immitis* im histologischen Schnitt darüberhinaus mit den großen, leeren Einzelzellen von *Blastocystis dermatitidis* verwechselt werden können und freie Endosporen in ihrer Größe den Zellen von *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* und von *Cryptococcus neoformans* ähneln (CHANDLER et al., 1980), sind - sofern keine Möglichkeiten zum molekularbiologischen oder immunhistologischen Nachweis zur Verfügung stehen - Serienschnitte von Vorteil, um intakte oder rupturierte Sphärulen mit Endosporen zu finden.

Immunhistologische Nachweismethoden können zur Detektion von *Coccidioides immitis* herangezogen werden. Dabei werden die Sphärulen bzw. die Endosporen durch die Verwendung spezifischer, gegen den Erreger gerichteter Primär-Antikörper, die Kopplung mit einem Enzymmarkierten Sekundäntikörper und die anschließende Umsetzung eines Substrates zu einem gefärbten Endprodukt markiert (WOHLSEIN et al., 1993).

Für eine gesicherte Diagnose sind molekularbiologische Nachweismethoden von Vorteil. Einerseits ist durch die hohe Spezifität der ISH eine genaue Bestimmung der infektiösen Pilze auf Artniveau möglich, wodurch die Effizienz einer klinischen Behandlung gesteigert werden kann, andererseits hat die ISH im Vergleich zur Kultivierung der Pilze einen entscheidenden zeitlichen Vorteil. Ergebnisse erhält man im Gegensatz zur Kultivierung, die mehrere Wochen in Anspruch nehmen kann, innerhalb von 24 Stunden (HAYDEN et al., 2001). Wie sich auch bei unserem Fall gezeigt hat, reagieren nicht alle Entwicklungsstadien von *Coccidioides immitis* in der ISH positiv - vereinzelt zeigten sogar volle Sphärulen kein oder nur ein schwaches Farbsignal. Möglicherweise führt die vermehrte Gewebsdegradation im betreffenden Areal zu einer Freisetzung von endogenen Nukleasen, die den Abbau der Pilz-Nukleinsäuren und dadurch die Nicht-Erkennung durch die Oligonukleotidsonde bedingen (HAYDEN et al., 2001).

Die Behandlung der Coccidioidomykose besteht in der langfristigen oralen Gabe von antifungalen Medikamenten, bei Hunden und Katzen wird Ketoconazol, Itraconazol und Fluconazol eingesetzt (GRAUPMANN-KUZMA et al., 2008). Der Zeitraum der Medikamentengabe ist von Tier zu Tier verschieden und kann sich bei Hunden, die meist gravierendere Knochenläsionen als Katzen aufweisen, bis zu über einem Jahr erstrecken (SHUBITZ et al., 2005).

Zusammenfassend kann zur Erlangung einer definitiven Diagnose der Coccidioidomykose die Durchführung einer Thorakoskopie zur Entnahme einer Biopsieprobe des veränderten Lungengewebes empfohlen werden. Anschließend ermöglichen die Kombination aus histologischen Routine-

färbungen (HE, GMS, PAS) und dem molekularbiologischen Nachweis mittels ISH unter Verwendung *Coccidioides*-spezifischer Oligonukleotidsonden eine gesicherte Bestimmung des Erregers.

Durch die steigende Mobilität der Besitzer und ihrer Hunde sowie durch den Import von Tieren aus Endemiegebieten ist auch in Österreich mit dem Auftreten von bisher hier unbekanntem Erregern und Krankheiten zu rechnen. Die Erhebung einer fundierten Reiseanamnese kann zur schnelleren korrekten Diagnosestellung beitragen.

Danksagung

Unser Dank gilt Dr. Glenn D. Roberts und Dr. Ricardo V. Lloyd (Division of Anatomic Pathology, Mayo Clinic, Minnesota, USA) für die Bestätigung unserer Diagnose mittels ISH sowie Klaus Bittermann und Gudrun Kurz für die exzellente fotografische und technische Assistenz.

Literatur

- ACKERMANN, M.R. (2009): Chronische Entzündung und Wundheilung. In: McGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. (eds.): Pathologie der Haustiere. Urban & Fischer in Elsevier, München/Jena, p. 149.
- ANONYMUS (2004): IOWA State University, Institute for International Cooperation in Animal Biologics; <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/coccidioidomycosis.pdf>, last update January 2004, last access May 2009.
- BRUNNBERG, L., HART, S., TOBIAS, R., WOHLSEIN, P. (1993): Disseminierte Kokzidioidomykose bei einem Hund. I. Klinische Befunde. Kleintierpraxis **38**, 83-88.
- BUIJZE, G.A., KOK, P., BOTHA-SCHEEPERS, S.A., SMITH, S.J., SLEEBOOM, H.P. (2008): Fungal disease of the Western hemisphere: a patient with coccidioidomycosis. European Journal of Internal Medicine **20**, 319-322.
- BUTKIEWICZ, C.D., SHUBITZ, L.F., DIAL, S.M. (2005): Risk factors associated with *Coccidioides* infections in dogs. Journal of American Veterinary Medical Association **226**, 1851-1854.
- CASTELOT, J.J., CREVELING, R.L., PITTS, F.W. (1960): Fatal military coccidioidomycosis complicating prolonged prednisone therapy in a patient with myelofibrosis. Annals of Internal Medicine **52**, 254-258.
- CHANDLER, F.W., KAPLAN, W., AJELLO, L. (1980): A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases. Wolfe Medical Publications Ltd., London, p. 50-53.
- COX, R.A., MAGEE D.M. (2004): Coccidioidomycosis: host response and vaccine development. Clinical Microbiology Reviews **17**, 804-839.
- DAVIDSON, A.P., PAPPAGIANIS, D. (1994): Canine coccidioidomycosis: 1970-1993. Proc. 5th Int. Conf. Coccidioidomycosis, Stanford, p. 155-162.
- DESAI, S.A., MINAI, O.A., GORDON, S.M., O' NEILL, B., WIEDEMANN, H.P., ARROLIGA, H.C. (2001): Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. Respiratory Medicine **95**, 305-309.
- GINO-MOOR, S., PAZ, A., PICK, N., POTASMAN, I. (2003): Pulmonary coccidioidomycosis acquired during travel - a diagnostic and therapeutic challenge. Travel Medicine and Infectious Disease **1**, 53-57.
- GRAUPMANN-KUZMA, A., VALENTINE, B.A., SHUBITZ, L.F., DIAL, S.F., WATROUS, B., TORNQUIST, S. (2008): Coccidioidomycosis in dogs and cats: a review. Journal of American Animal Hospital Association **44**, 226-235.
- GREENE, R.T. (1998): Coccidioidomycosis. In: GREENE, C.E. (ed.): Infectious diseases of the dog and cat. 2nd ed., Saunders, Philadelphia, p. 391-398.
- HAYDEN, R.T., QIAN, X., ROBERTS, G.D., LLOYD, R.V. (2001): In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue sections. Diagnostic Molecular Pathology **10**, 15-23.
- JOHNSON, L.R., HERRGESELL, E.J., DAVIDSON, A.P., PAPPAGIANIS, D. (2003): Clinical, clinicopathologic and radiographic findings in dogs with coccidioidomycosis: 24 cases (1995-2000). Journal of American Veterinary Medical Association **222**, 461-466.
- KIRKLAND, T.N., FIERER J. (1996): Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. Emerging Infectious Diseases **2**, 192-199.
- MILLMAN, T.M., O'BRIEN, T.R., SUTER, P.F. (1979): Coccidioidomycosis in the dog: its radiographic diagnosis. Journal of American Veterinary Medical Association **20**, 50-65.
- NORDSTOGA, K., LINDQUIST, K., STRANDE, A. (1959): Coccidioidomycosis. Report of a case in a dog. Nordisk Veterinær Medicin **11**, 461-468.
- RIXFORD, E., GILCHRIST, T.C. (1896): Two cases of protozoan (coccidioidal) infection of the skin and other organs. The John Hopkins Hospital Reports **1**, 209-268.
- SHUBITZ, L.F. (2007): Comparative aspects of coccidioidomycosis in animals and humans. Annals of the New York Academy of Sciences **1111**, 395-403.
- SHUBITZ, L.F., DIAL, S.M. (2005): Coccidioidomycosis: a diagnostic challenge. Clinical Techniques in Small Animal Practice **20**, 220-226.
- SHUBITZ, L.F., BUTKIEWICZ, C.D., DIAL, S.M., LINDAN, C.P. (2005): Incidence of *Coccidioides* infection among dogs residing in a region in which the organism is endemic. Journal of the American Veterinary Medical Association **226**, 1846-1850.
- STAMM, B., RAGAZ, A. (2008): Kokzidioidomykose - überraschendes Ergebnis der Abklärung eines Lungenrundherdes. Swiss Medical Forum/Schweizerisches Medizin-Forum **8**, 526-527.
- STEVENS, D.A. (1995): Coccidioidomycosis. New England Journal of Medicine **332**, 1077-1082.
- WILSON, J.W. (1962): Factors which may increase the severity of coccidioidomycosis. Laboratory Investigation **11**, 1146-1150.
- WOHLSEIN, P., POHLENZ, J., SCHÖNECK, C., HART, S., BRUNNBERG, L. (1993): Disseminierte Kokzidioidomykose bei einem Hund. II. Pathomorphologische Befunde. Kleintierpraxis **38**, 149-154.

Anschrift der Verfasser:

Dr. Barbara Rebel-Bauder, Dr. Frank Künzel, Dipl. Tzt. Matthias Schweda, Dr. Reinhard Hirt, Dr. Jasmin Hassan, Dr. Angelika Url, Veterinärplatz 1, A-1210 Wien.
e-mail: barbara.rebel-bauder@vetmeduni.ac.at

Quergelesen

Der Katze abgeschaut

Einem schon länger zurückliegenden Aufsatz¹ von Dr. med.vet. Bernd Dürnberger entnehmen wir die Forschungsergebnisse von Elisabeth von Muggenthaler (z.B.: www.animalvoice.com/catpurrP.htm): Das Schnurren der Katze dient nicht nur der Kommunikation sondern auch der Streßminderung und der Selbstheilung. Mit den Vibrationen, vor allem bei 25 und 50 Hz, wird unter anderem das Knochenwachstum nach Brüchen gefördert.

In der Humanmedizin wird Vibrationstraining z.B. bei Osteoporose eingesetzt. So haben VERSCHUEREN et al. (Journal of Bone and Mineral Research **19**, 352-359, 2004) gezeigt, daß Training (3x wöchentlich, 24 Wochen) auf einer Vibrationsplattform (35-40 Hz) an Frauen im Alter von 58-74 Jahren zu einer signifikanten Erhöhung der Knochendichte führt.

¹Quelle: MEDIZINpopulär vom 3. November 2008, p. 78-80.