

Aspergillosi sistemica in un pastore tedesco

RIASSUNTO

Le infezioni da *Aspergillus* spp. nel cane coinvolgono frequentemente le cavità nasali e i seni paranasali riconoscendo come agente eziologico principale *A. fumigatus*. Il coinvolgimento sistemico rappresenta una rara evenienza, con esito spesso fatale. Si descrive un caso di aspergillosi sistemica in un cane pastore tedesco, con lesioni granulomatose e necrotiche a livello linfonodale multiplo, polmonare, splenico ed epatico. L'esame citologico del versamento pleurico evidenziava la presenza di ife fungine settate con divisione dicotomica e formazione di ramificazioni a 45° tipiche dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*. Le indagini micologiche, istopatologiche e di biologia molecolare eseguite consentivano l'identificazione di *Aspergillus terreus* quale agente eziologico dell'infezione sistemica.

INTRODUZIONE

Le infezioni da miceti del genere *Aspergillus* sono di comune riscontro negli animali domestici, in particolare *Aspergillus fumigatus* è ritenuto responsabile del 90-95% delle aspergillosi rilevate nel cane (otiti esterne, riniti croniche)¹. Sono state descritte numerosissime specie di *Aspergillus* molte delle quali sono saprofiti innocui; tra le altre specie che occasionalmente possono causare infezione sono da considerare *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans*. Tali organismi sono ubiquitari e possono essere isolati dal terreno, dall'aria, dalla vegetazione¹.

La forma sistemica di aspergillosi nel cane è stata descritta in vari paesi (Australia, California, Spagna, Belgio, Regno Unito, Sud Africa, Stati Uniti) ma probabilmente è più diffusa di quanto la scarsa letteratura scientifica presente possa far pensare. Le specie maggiormente coinvolte in ordine di frequenza sono *A. terreus*, *A. deflexus*, *A. flavipes* e *A. fumigatus*². La presentazione clinica sembra essere simile, indipendentemente dalla specie infettante³.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso osservato si riferisce a "Zara", un pastore tedesco, femmina, di 9 anni di età portato a visita per l'insorgenza di una grave depressione presente da circa 4 giorni, associata ad anoressia e difficoltà respiratoria. L'esame obiettivo dell'animale metteva in evidenza una marcata depressione del sensorio con grave dispnea e distensione addominale. Venivano effettuati un esame emocromocitometrico ed un esame biochimico che rilevavano la presenza di una leucocitosi con leucogramma infiammatorio, associata a piastrinosi e ad aumento dell'attività sierica di ALPK, ALT e AST. L'esame radiografico del torace in posizione ventro-dorsale e latero-laterale mostrava un abbondante versamento pleurico bilaterale. Dopo toracocentesi le radiografie evidenziavano un pattern polmonare diffuso di tipo alveolo-interstiziale ed una marcata linfadenomegalia dei linfonodi mediastinici. L'ecoaddome rilevava un modesto versamento peritoneale, epatomegalia con disomogeneità del parenchima, splenomegalia associata alla presenza di formazioni nodulari multiple e linfadenomegalia dei linfonodi iliaci (Fig. 1).

Si eseguiva toracocentesi terapeutica ed aspirazione ecoguidata dei linfonodi mediastinici con allestimento di preparati citologici, asciugati all'aria e colorati con colorazione rapida tipo Romanowsky; dagli stessi linfonodi si eseguiva, al contempo un prelievo ecoguidato, tramite ago di Tru-Cut ("Supercore biopsy instrument" da 18 G x 20 cm) per via transcutanea. Il liquido pleurico era di aspetto torbido e colore giallastro; citologicamente risultava costituito da abbondante materiale amorfo basofilo necrotico con detriti cellulari, frammisto al quale erano presenti macrofagi, granulociti neutrofili ipersegmentati e degenerati e cellule mesoteliali attivate. Ad una attenta osservazione dei preparati si potevano evidenziare strutture costituite da strie ottica-

Monica Sforna¹, DVM, PhD

Elvio Lepri¹, DVM, PhD, Dip. ECVF

Chiara Brachelente¹, DVM, PhD, Dip. ECVF

Daniela Mignacca², DVM

Alfredo Dentini¹, DVM

Fabrizio Passamonti³, DVM, PhD

¹ Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle produzioni Animali e Alimentari, Università di Perugia, Perugia

² Clinica Veterinaria Roma Sud, Via Pilade Mazza, 24 - Roma

³ Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università di Perugia, Perugia

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 10/11/2010 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 02/09/2011".

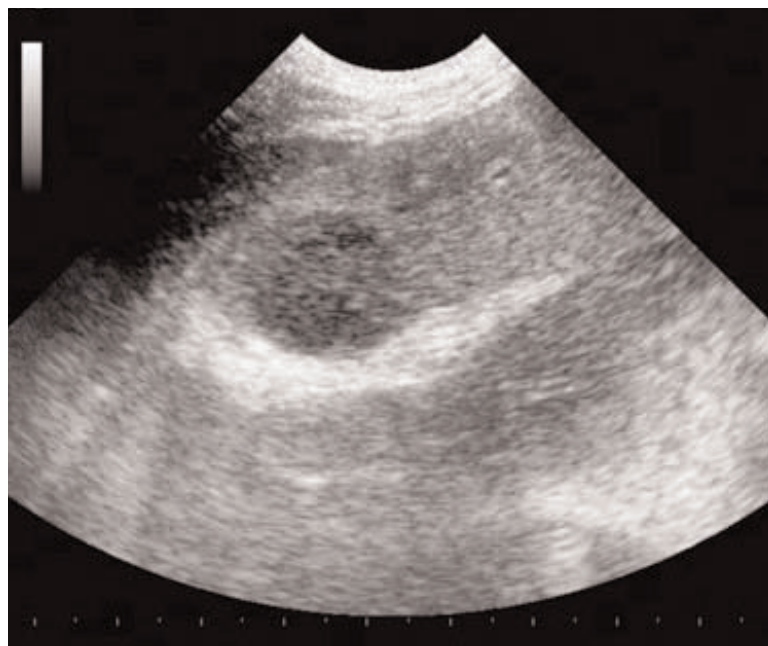


FIGURA 1 - Immagine ecografica di uno dei noduli splenici che appare ipoecogeno e dotato di capsula che deforma l'organo.

mente vuote, spesso intersecanti tra loro, solo occasionalmente contenute nel citoplasma dei macrofagi. Tali strutture, morfologicamente compatibili con ife fungine, mostravano un diametro variabile da 3 a 8 μm ed erano caratterizzate da evidenti settature e da una divisione di tipo dicotomico, con formazioni ramificate a 45° . Alla reazione all'acido periodico-reattivo di Schiff (PAS), eseguita successivamente come approfondimento diagnostico, si evidenziava un'intensa positività delle ife. Gli stessi reperti caratterizzavano gli esami citologici ottenuti dai linfonodi mediastinici dove ancora più numerose risultavano le ife fungine, la cui citologia appariva meglio conservata ed associata al rinvenimento di cellule giganti

multinucleate e di numerosi batteri di forma coccoide all'interno di granulociti neutrofili (Fig. 2A, B). Pertanto, sulla base di tali reperti, veniva formulata una diagnosi citologica di pleurite e linfadenite piogranulomatosa associata alla presenza di ife fungine e batteri coccacei. L'esame istopatologico eseguito sul tessuto prelevato mostrava l'esclusiva presenza di materiale necrotico, all'interno del quale si rinvenivano gli stessi elementi fungini PAS-positivi. Sulla base della diagnosi emessa è stata quindi improntata una terapia con itraconazolo, 10 mg/kg q24h, fluidoterapia e terapia antibiotica con amoxicillina e acido clavulanico (22 mg/kg q12h) associata ad enrofloxacin (5 mg/kg q24h) in attesa dei risultati dell'esame colturale e dell'antibiogramma. Ciononostante il paziente veniva a morte spontaneamente dopo due giorni in seguito ad un peggioramento delle condizioni generali con crisi respiratoria. In sede post-mortem è stato possibile prelevare solo frammenti di tessuto splenico e di linfonodo inguinale che sono stati in parte fissati in formalina neutra tamponata al 10%, in parte inviati ad un laboratorio di batteriologia ed in parte utilizzati per l'allestimento di altri preparati citologici.

Le citologie spleniche e linfonodali mostravano un quadro sovrapponibile a quelle già eseguite evidenziando la presenza di un numero rilevante di batteri coccacei nei linfonodi inguinali. Le colture venivano allestite in Sabouraud destrosio agar con l'aggiunta di 0,05 g/l di cloramfenicolo e incubate a 37°C fino a 7 giorni e a 25°C per 12 giorni. Le colonie, cresciute al quinto giorno d'incubazione a 37°C , avevano una colorazione che, da bianca, tendeva a diventare color cannella ed una morfologia piatta e cotonosa (Fig. 3); attraverso l'apposizione di nastro adesivo sulle colonie ottenute e successiva colorazione con blu di lattofenolo si poteva osservare l'esatta morfologia del micete identificato come *Aspergillus* spp. I funghi appartenenti a

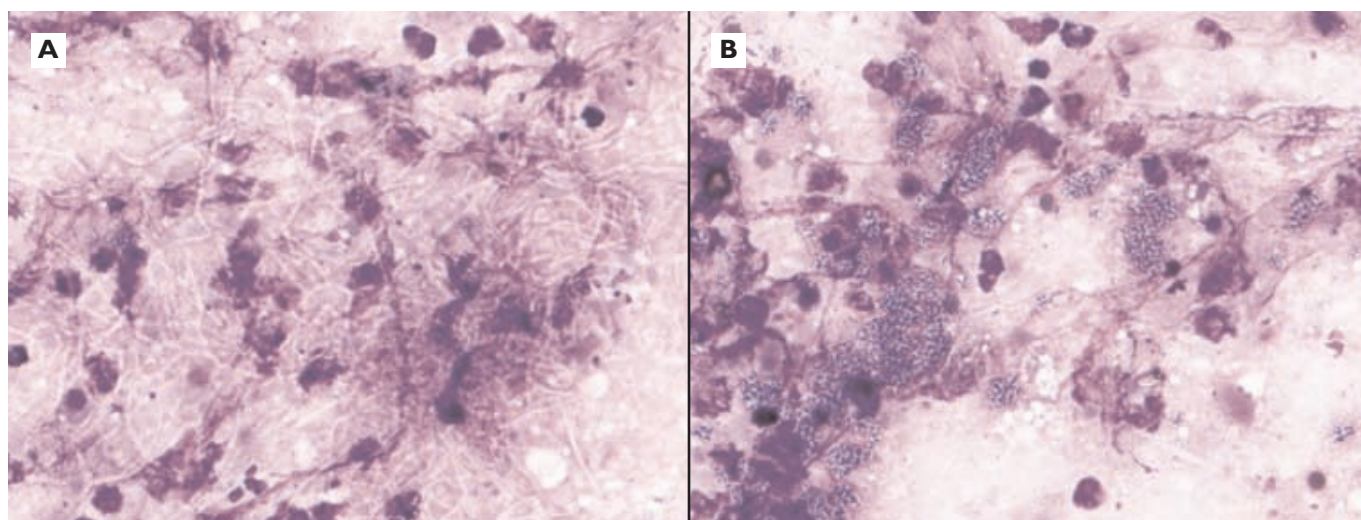


FIGURA 2 - Agoaspirati da linfonodi mediastinici. Si osservano numerose strie otticamente vuote, riferibili ad ife fungine, frammiste a materiale necrotico e detriti cellulari (A). Presenza di un numero rilevante di germi di forma coccoide all'interno di granulociti neutrofili (B). Diff-Quik®, 20x.

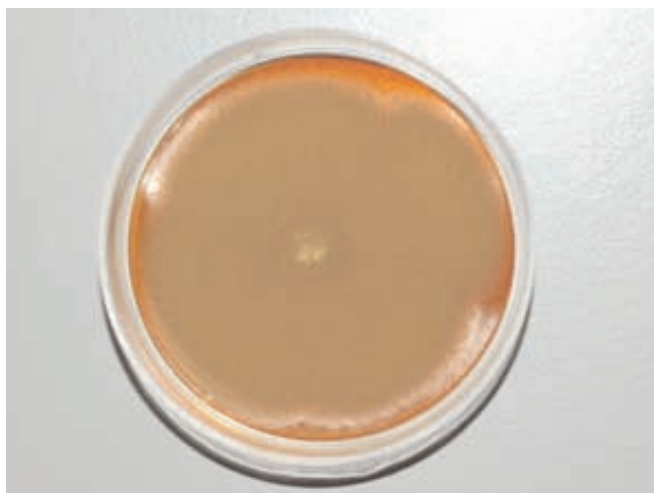


FIGURA 3 - *A. terreus* in terreno di Sabouraud destrosio agar al 7° giorno. Colonie color cannella piatte e cotonose.

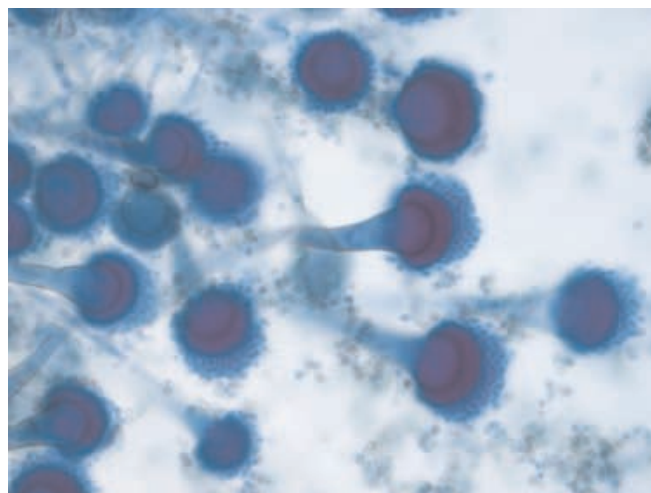


FIGURA 4 - Conidiofori e conidi di *A. terreus*. Blu di lattofenolo, 40x.

questo genere hanno, infatti, caratteristiche peculiari sia per ciò che riguarda gli aspetti macroscopici delle colonie, di diversi colori a motivo della produzione di spore pigmentate, sia per gli aspetti microscopici caratterizzati dalla presenza di ife settate e formazione di piccole catene di conidi (2-3 μ m) di forma sferica o ovale, posizionati su un conidioforo che termina in una vescicola¹ (Fig. 4). Gli esami colturali eseguiti avevano evidenziato la crescita di batteri tipizzati successivamente come *Staphylococcus pseudintermedius*. I campioni istopatologici provenienti da tessuto splenico e linfonodale mostravano ampie aree necrotiche e la presenza di un infiltrato da nodulare a diffuso caratterizzato da un numero elevato di cellule epitelioidi-macrofagiche, da un numero minore di linfociti, plasmacellule e granulociti neutrofili associati a numerose cellule giganti multinucleate. Nella milza si osservava-

no frequenti lesioni nodulari di tipo granulomatoso con un centro necrotico, talvolta calcificato. All'interno dei granulomi e parzialmente fagocitati dai macrofagi e dalle cellule multinucleate, erano presenti numerosi elementi fungini, intensamente positivi con la colorazione di PAS (Fig. 5A) e con il metodo Argento-Metenamina Gomori-Grocott (GMS) (Fig. 5B). Nel complesso le lesioni istopatologiche erano rappresentate da splenite e linfadenite piogranulomatoze e necrotizzanti associate ad elementi micotici intralesionali.

Dalle colture allestite inizialmente sono state effettuate delle indagini molecolari tramite *polymerase chain reaction* (PCR); il DNA è stato estratto dalle colonie fungine⁴, amplificato utilizzando primers fungini specifici⁵ e il prodotto amplificato è stato sequenziato. I risultati ottenuti hanno consentito di identificare il fungo come *Aspergillus terreus*.

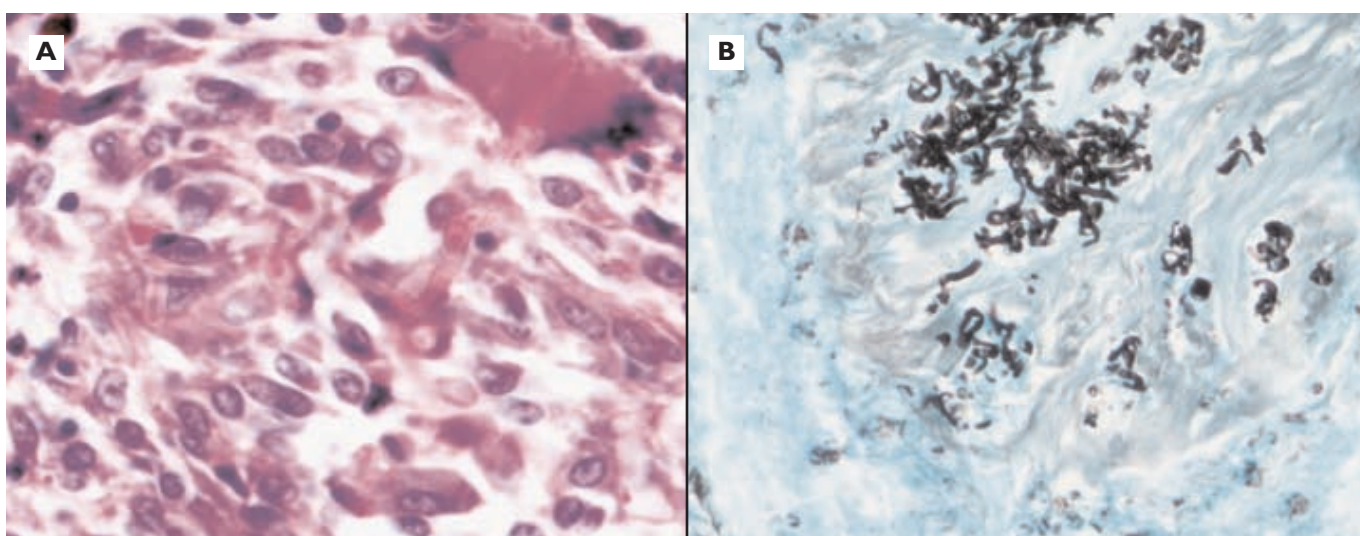


FIGURA 5 - Evidenziazione di spore ed ife fungine di *Aspergillus* spp all'interno dei granulomi splenici. **A)** Gli elementi fungini appaiono rosso magenta alla colorazione PAS in associazione a cellule epitelioidi e cellule giganti multinucleate. È possibile osservare la settatura delle ife. PAS, 40x. **B)** Colorazione nera dei miceti al metodo Argento-Metenamina Gomori-Grocott (GMS). GMS, 20x.

DISCUSSIONE

Nel cane e nel gatto *Aspergillus* spp è per lo più responsabile di infezioni nasali o polmonari, raramente di forme disseminate. Il pastore tedesco è stato già descritto come razza suscettibile alle infezioni opportuniste, quali aspergillosi, ialoifomicosi e rickettsiosi². I fattori predisponenti nei confronti dell'aspergillosi canina sono legati alle condizioni climatiche (caldo secco), alla possibilità di esposizione a particolari ceppi di *Aspergillus* e alla presenza di difetti dell'immunità mucosale che potrebbero riconoscere una base genetica^{2,6,7}. Bruchim et al. indicano un basso livello sierico di immunoglobuline A in 3 dei 9 cani descritti con aspergillosi sistemica ipotizzando un ruolo patogenetico nella malattia di difetti dell'immunità secretoria locale⁸. Studi recenti hanno confermato la predisposizione a sviluppare aspergillosi sistemica nel pastore tedesco di giovane o media età e di sesso femminile, solo raramente correlata a stati di immunodepressione³.

Lo stato di immunocompetenza del soggetto rappresenta una condizione importante nello sviluppo di infezioni opportuniste; nell'uomo, infatti, l'aspergillosi disseminata è spesso conseguente a stati di immunodeficienza o immunosoppressione (es. chemioterapia, trapianti di midollo osseo)^{2,9}. La risposta protettiva immune per *Aspergillus* è stata descritta in modelli murini ed include l'intervento di meccanismi innati (es. espressione dei recettori Toll-like 2 da parte delle cellule polmonari dendritiche) associati alla risposta immunitaria specifica regolata dai linfociti T helper 1 (Th1) e caratterizzata dalla produzione di citochine quali IL-18 e IL-12, TNF, INF- γ . I soggetti che mostrano un'immunità dominante di tipo Th2 sviluppano malattia progressiva². Studi più recenti condotti in particolare sull'aspergillosi seno-nasale canina (sino-nasal aspergillosis - SNA) hanno meglio caratterizzato il tipo di risposta immune locale ed i meccanismi patogenetici di tale condizione indicando il modello immunologico canino come utile strumento nello studio delle sinusiti micotiche croniche non invasive dell'uomo¹⁰. I profili citochinici valutati in questi animali hanno confermato il modello di risposta murino sottolineando, inoltre, l'espressione di diverse subunità della famiglia dell'IL-12 e la formazione di IL-23, citochina fondamentale per la attivazione di cellule Th 17. Questa sottopopolazione di cellule T Cd4⁺ sembra svolgere un ruolo chiave in varie malattie di natura infettiva, neoplastica e autoimmune correlata ad una risposta immune di tipo Th1¹⁰. In particolare nell'aspergillosi si ritiene che le cellule Th 17 agiscano promuovendo l'infiammazione neutrofila, inibendo al contempo l'azione fungicida di queste cellule, perpetuando così l'infezione e la risposta infiam-

matoria associata alla stessa, neutralizzando l'effetto protettivo della risposta Th1¹⁰. Questi studi dimostrano che *Aspergillus* fa parte della normale flora delle alte vie respiratorie del cane non essendo tuttavia correlato ad infiammazione nella maggior parte dei cani. Resta perciò da chiarire quale sia il meccanismo iniziale che dà origine all'infezione considerando, tra le varie ipotesi da indagare ulteriormente, la presenza di una predisposizione genetica o di difetti dell'immunità mucosale dei soggetti affetti.

Si ritiene che la via di ingresso principale di *Aspergillus* sia quella respiratoria con successiva disseminazione per via ematogena, sebbene alcuni dei casi riportati in letteratura non presentavano coinvolgimento respiratorio, suggerendo la possibilità di altre vie di ingresso, come ad esempio la cute, il capezzolo, la via gastroenterica e quella urinaria^{7,8}. Nei pochi lavori che descrivono casi di aspergillosi sistemica i segni clinici più comunemente associati all'infezione sono rappresentati da perdita di peso, febbre, malattie oculari, deficit neurologici, dolore alla colonna vertebrale, zoppia, questi ultimi spesso associati a discospondiliti e ad osteomieliti^{3,8}. In una delle casistiche più ampie comprendenti 30 cani con diffusione sistemica la metà presentava segni di insufficienza renale³. Nel caso riportato sono stati esclusi, attraverso le indagini strumentali, sia segni di coinvolgimento osseo che renale, sottolineando a nostro avviso l'importanza di considerare l'aspergillosi sistemica tra le diagnosi differenziali di lesioni spleniche nodulari ipocogene con linfadenomegalia, identificabili all'esame ultrasonografico.

La diagnosi di aspergillosi sistemica risulta piuttosto difficoltosa. In medicina umana non esiste a tutt'oggi un vero e proprio test "gold standard" poiché l'isolamento dell'agente eziologico su materiale biotico non è sempre attuabile limitando spesso il sospetto diagnostico al quadro clinico e radiografico del paziente⁹. Nonostante tecniche sierologiche quali l'immunodiffusione doppia in gel di agar e la counter immunoelettroforesi siano da alcuni autori ritenute sensibili e specifiche, la sierologia appare di applicabilità limitata in quanto anticorpi nei confronti di *Aspergillus* vengono prontamente rilevati in cani sani mentre alcuni cani infetti risultano sieronegativi⁷. Altri studi sottolineano, invece, anche la scarsa sensibilità dell'immunodiffusione in gel di agar³. Le indagini istopatologiche consentono una diagnosi generica di micosi non riuscendo tuttavia ad individuare la specie coinvolta. L'applicazione di tecniche molecolari quali la PCR può essere utile nell'ottenimento di una diagnosi tempestiva ed accurata, come dimostrato nel nostro caso.

Il caso descritto, inoltre, sottolinea la validità dell'esame citologico nella diagnostica ante-mortem

di questa malattia quale tecnica rapida ed efficace nell'identificare quelle che spesso sono le uniche strutture riconoscibili, cioè le ife fungine, ancor più se alle colorazioni classiche si affiancano colorazioni citochimiche più specifiche come la PAS.

Il trattamento con somministrazione orale di itraconazolo sembra essere quello di elezione per un'infezione sistemica causata da *Aspergillus terreus*; segnalazioni riportate descrivono lunghi tempi di sopravvivenza (190-1095 giorni) rispetto a cani non trattati con itraconazolo, i cui tempi medi di sopravvivenza risultano decisamente inferiori (52 giorni)^{6,8}. La prognosi nei cani gravemente malati è comunque infausta².

Il caso descritto evidenziava una concomitante infezione batterica; non è da escludere pertanto che il soggetto potesse presentare dei difetti della risposta immunitaria. Questo suggerisce l'importanza di indagare ulteriormente gli animali affetti da micosi sistemiche invasive, per valutare il tipo di risposta immunitaria prevalentemente espressa e le eventuali correlazioni con l'insorgenza delle forme morbose, così anche da poter verificare se gli stessi modelli immunologici proposti per le infezioni nasali da *Aspergillus* possano essere applicati alle forme di disseminazione sistemica del fungo.

Parole chiave

Cane, pastore tedesco, micosi sistemica, citologia, ife setolate, *Aspergillus terreus*.

■ Systemic aspergillosis in a German shepherd dog

Summary

In the dog infections by *Aspergillus* spp. frequently affect nasal cavity and sinuses and are mainly caused by *A. fumigatus*. Systemic involvement has usually a poor prognosis and is often fatal. A case of systemic aspergillosis in a German shepherd dog, with granulomatous and necrotic lesions involving multiple lymph nodes, lung, spleen and liver, is described. The cytological examination of pleural effusion showed the presence of septated fungal hyphae with dichotomous branching at 45° typical of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Mycological, histopathological and molecular biology investigations identified *Aspergillus terreus* as the causative agent of the systemic infection.

Key words

Dog, German Shepherd, systemic mycosis, cytology, septated hyphae, *Aspergillus terreus*.

il controllo dell' iperadrenocorticismo (Cushing) del cane

SEMPLICE

RAPIDO

CON EFFETTO
REVERSIBILE

NESSUN EFFETTO
CITOTOSSICO

MARCHIO REGISTRATO

new

Ora disponibile la nuova
confezione da 10 mg



BIBLIOGRAFIA

1. P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter: *Clinical Veterinary Microbiology*, Chapter 40, 391-394; Mosby, Edimburgh, 1999.
2. K.G. Mathews, N.J.H. Sharp and M.J. Day: *Aspergillosis and Penicilliosis* in C.E. Greene: *Infectious diseases of the dog and cat*, 3th edition, Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006, pp. 613-627.
3. R.M. Schultz, E.G. Johnson, E.R. Wisner, N.A. Brown et al.: *Clinicopathologic and Diagnostic Imaging Characteristics of Systemic Aspergillosis in 30 Dogs*, *J Vet Intern Med*; 22:851-859, 2008.
4. M. Kumar and P.K. Shukla: *Use of PCR Targeting of Internal Transcribed Spacer Regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis of Sequence Variation in Different Regions of rRNA Genes in Fungi for Rapid Diagnosis of Mycotic Keratitis*; *J Clin Microbiol*, 43, 2, 662-668, 2005.
5. M. Sanguinetti, R. Porta, M. Sali, M. La Sorda, et al.: *Evaluation of VITEK 2 and Rapid Yeast Plus Systems for Yeast Species Identification: Experience at a Large Clinical Microbiology Laboratory*; *J Clin Microbiol*, 45, 4, 1343-1346, 2007.
6. E. Kulendra, Z. Halfacree, R. Goggs, S. Dennis et al.: *Cavitary pulmonary lesion associated with Aspergillus fumigatus infection in a German shepherd dog*; *Journal of Small Animal Practice*, 51, 271-274, 2010.
7. K.K. Adamama-Moraitou, D. Pardali, M.J. Day, D.W. Denning, L. Papanoglou et al.: *Aspergillus fumigatus Bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd Dog*; *Journal of American Animal Hospital Association*, 47:e13-e18, 2011.
8. Y. Bruchim, D. Elad and S. Klainbart: *Disseminated aspergillosis in two dogs in Israel*; *Mycoses*; 49, 130-133, 2006.
9. M.J. Day: *Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease*; *Medical Mycology*, 1-9, 2008.
10. C. R. Thornton: *Detection of invasive aspergillosis*; *Advances in Applied Microbiology*, 70, 187-216, 2010.