

Aus dem Department für Pathobiologie der  
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Pathologie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Herbert Weissenböck Dipl.ECPHM)

**Untersuchung von Lungengewebsproben von Felidae auf das Vorkommen  
von *Pneumocystis* spp. mittels *In situ*-Hybridisierung**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Magdalena Marie Klier

Wien, im April 2022

Betreuerin: Priv. Doz.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> Christiane Weissenbacher-Lang

Betreuende medizinisch-technische Assistentin: Dr.<sup>in</sup> Julia Matt

Institut für Pathologie, Department für Pathobiologie

Gutachterin: Univ.-Prof.<sup>in</sup> Monika Ehling-Schulz

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht.....	3
2.1. Historischer Hintergrund, Zuordnung und Taxonomie .....	3
2.2. Wirtsspezifität und Charakteristika von <i>Pneumocystis</i> .....	5
2.3. Klinik, Immunreaktion, Prophylaxe, Therapie.....	9
2.4. Nachweismethoden.....	15
3. Material .....	17
4. Methoden.....	18
4.1. Herstellung histologischer Schnitte aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem .....	18
Material mittels Schlittenmikrotom (Microm HM 400, Thermo Scientific) .....	18
4.2. <i>In situ</i> -Hybridisierung.....	19
4.3. Hämatoxylin & Eosin-Färbung .....	21
4.4. Beurteilung der hergestellten ISH-Schnittpräparate.....	21
5. Ergebnisse.....	23
5.1. Ergebnisse der ISH.....	23
5.2. Ergebnisse der H&E-Färbung.....	24
5.3. Vorerkrankungen und Koinfektionen .....	27
5.4. Zusammenführung der Ergebnisse der ISH und der H&E-Färbung.....	28
6. Diskussion.....	34
7. Zusammenfassung.....	39
8. Anhang .....	42
8.1 Rezepturen .....	42
9. Literaturverzeichnis.....	43

## 1. Einleitung

Bei *Pneumocystis* handelt es sich um eine Gattung von Pilzen, die zahlreiche wirtsspezifische Spezies dieser eukaryotischen Mikroorganismen umfasst, welche den unteren Atmungstrakt von Land-, Luft- und Wassersäugetern besiedeln (Aliouat-Denis et al. 2008, Dei-Cas et al. 2006). Alle Individuen können sich mit dem Pilz infizieren, eine Proliferation und eine damit einhergehende klinische Erkrankung tritt gehäuft unter immunsuppressiven Bedingungen auf, weshalb der opportunistische Infektionserreger besonders in den 1980er Jahren im Zusammenhang mit zunehmenden HIV-Infektionen große Bekanntheit erlangte (Calderón-Sandubete et al. 2002, Glatt und Chirgwin 1990, Selik et al. 1984, Selik et al. 1987, Working Group on PCP Prophylaxis for Children 1995).

Auch in der Veterinärmedizin kann man ein wachsendes wissenschaftliches Interesse an *Pneumocystis* erkennen, was die vergleichsweise große Anzahl an Publikationen seit der Entdeckung des Erregers belegt. Der Schwerpunkt dieser Studien liegt bei Labortieren, Frettchen, Hunden und Wildtieren (Dei-Cas et al. 1998, Farrow et al. 1972, Keely et al. 2004, Mazars et al. 1997b, Watson et al. 2006). Tierartliche Unterschiede zeigen sich in der Charakterisierung und dem Schweregrad der verursachten Pneumonien. So zeigen infizierte Schweine interstitielle und granulomatöse Pneumonien (Binanti et al. 2014), während es bei Hunden zu einer Zerstörung des Lungenparenchyms kommen kann (Weissenbacher-Lang et al. 2017a). Bei Wiederkäuern konnten überwiegend milde Infektionen mit Dystelektasen, Alveolarhistiozytosen sowie peribronchialen, interstitiellen und perivaskulären Rundzellinfiltrationen nachgewiesen werden (Ergin 2018).

Die Anzahl an Studien zu Infektionen mit *Pneumocystis* bei Katzen ist sehr begrenzt und reicht über den Zeitraum von 1909-2019 (Danesi et al. 2019, Hagler et al. 1987, Settnes und Hasselager 1984, Shiota et al. 1990, Yang et al. 1996, Zavala und Rosado 1972). Diese Studien beschäftigten sich mit der Erhebung der *Pneumocystis*-Prävalenz in Katzenpopulationen (Zavala und Rosado 1972), der Annahme der Funktion von Katzen als Erregerreservoir (Settnes und Hasselager 1984) sowie der Übertragung des Erregers (Yang et al. 1996), der Untersuchung des Einflusses von Immunsuppression auf das klinische Bild

(Hagler et al. 1987, Shiota et al. 1990) und molekular diagnostischen Nachweismethoden (Danesi et al. 2019).

In der vorliegenden Arbeit soll mittels *In situ*-Hybridisierung (ISH) die Prävalenz von *Pneumocystis* spp. im Lungenparenchym von Felidae festgestellt werden. Danach erfolgt eine Korrelation der mittels ISH erzielten Ergebnisse mit den in der Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung histologisch festgestellten Lungenläsionen sowie mit der Krankengeschichte.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Historischer Hintergrund, Zuordnung und Taxonomie

Nach der Entdeckung von *Pneumocystis* durch Carlos Chagas im Jahr 1909 und der Identifikation als eigene Gattung durch Delanoë und Delanoë 1912 (Chagas 1909, Delanoë und Delanoë 1912), deren Untersuchungen sich überwiegend auf tierisches Lungengewebe beschränkten, war das diesbezügliche Forschungsinteresse zunächst limitiert (Calderón-Sandubete et al. 2002). Erst 20 Jahre später konnte ein erster Zusammenhang zwischen *Pneumocystis* und humanen Pathologien festgestellt werden. Hierbei handelte es sich um die sogenannte interstitielle Plasmazell-Pneumonie, von der vor allem Frühgeborene und unterernährte Säuglinge während des zweiten Weltkriegs betroffen waren (Ammich 1938, Baar 1955, Freudenberg und Tobler 1950, Gajdusek 1957, Van der Meer und Brug 1942, Vanek et al. 1953). Seit den 1980er Jahren ist zudem bekannt, dass Individuen, die sich einer Organtransplantation oder Chemotherapie unterziehen sowie Personen, welche mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert sind, durch die damit einhergehende Immunsuppression besonders anfällig für eine Infektion sowie eine klinische Erkrankung mit *Pneumocystis* sind (Cardenal et al. 2001, Selik et al. 1987).

In einigen Studien konnte festgestellt werden, dass sich *Pneumocystis*-bedingte Pneumonien nicht nur auf immunsupprimierte Patienten beschränken. So konnten beispielsweise durch molekulare Nachweismethoden *Pneumocystis*-Organismen im Probenmaterial gesunder oder hospitalisierter Patienten ohne offensichtliche Immunsuppression nachgewiesen und das Bestehen transienter und latenter Infektionen bestätigt werden (Calderón et al. 1996, Calderón et al. 2004, Cano et al. 1993, Dei-Cas 2000, Jacobs et al. 1991, Peterson und Cushion 2005, Vargas et al. 2005).

Die taxonomische Zuordnung von *Pneumocystis* stellt einen langwierigen Prozess dar, der sich von der ersten Entdeckung durch Carlos Chagas (Chagas 1909) Anfang des 20. Jahrhunderts bis in die 1980er Jahre erstreckte (Edman et al. 1988, Stringer et al. 1989b). Bei seinen Forschungen an mit Trypanosomen inokulierten Meerschweinchen entdeckte Carlos Chagas 1909 im Lungengewebe der Tiere erstmals zystische Formen von

*Pneumocystis*, welche er fälschlicherweise als neue Trypanosomen-Gattung identifizierte (Calderón-Sandubete et al. 2002, Chagas 1909). Ähnliche Zysten fand Antonio Carini, damals Direktor des Sao Paulo Pasteur-Instituts, ein Jahr später in den Lungen von Ratten, welche mit *Trypanosoma lewisi* infiziert waren (Carini 1910).

Mit der Vermutung, die Zysten gehörten zu einer bisher unbekanntem Spezies, schickte er Gewebeproben an das Pasteur-Institut in Paris, wo das Ehepaar Delanoë ähnliche Zysten im Lungengewebe von Wanderratten gefunden hatte, welche nachweislich nicht mit Trypanosomen infiziert waren. Sie folgerten aus ihrer Beobachtung, dass die zuvor von Chagas und Carini beschriebenen zystischen Formen einem neuen Mikroorganismus zugeordnet werden könnten, den sie *Pneumocystis (P.) carinii* nannten. Anstelle einer Verwandtschaft mit Trypanosomen vermutete das Paar einen potentiellen Zusammenhang mit Kokzidien (Delanoë und Delanoë 1912).

Der lateinische Name des neu entdeckten eukaryotischen Mikroorganismus, „*Pneumocystis carinii*“, setzt sich aus drei Teilen zusammen: „Pneumo-“ aufgrund des Tropismus zu Lungengewebe, „cystis“ infolge der charakteristischen Form und „carinii“ zu Ehren Dr. Antonio Carinis, welcher Gewebeproben nach Paris sandte (Delanoë und Delanoë 1912). Der Genus *Pneumocystis* umfasst einzellige, an Säugetierlungen angepasste Organismen (Bartlett et al. 1994), unter welchen sechs Arten anerkannt sind. Neben den bereits bekannten Arten *P. jirovecii* (Mensch) (Frenkel 1999), *P. wakefieldiae* (Ratte) (Cushion et al. 2004), *P. murina* (Maus) (Keely et al. 2004), *P. oryctolagi* (Kaninchen) (Dei-Cas et al. 2006) und *P. carinii* zählt seit 2020 auch *P. canis* zu den anerkannten Arten (Cissé et al. 2021, Ma et al. 2020).

Die Einordnung der verschiedenen *Pneumocystis*-Spezies erfolgt nach dem International Code of Botanical Nomenclature (ICBN). Spezies ohne Eigennamen wurden früher nach dem Forma specialis-Trinominalsystem bezeichnet (Bartlett et al. 1994). Inzwischen werden solche Spezies nur mehr als *Pneumocystis* sp. und anschließend der Tierart bezeichnet (Ma et al. 2020). Der bei Katzen nachgewiesene Erreger wird daher mit *Pneumocystis* sp. *felis* angesprochen.

Die Kontroverse der taxonomischen Zuordnung von *Pneumocystis*, insbesondere die Diskussion über die Zugehörigkeit zur Gattung der Pilze oder der Protozoen begann bereits

1913 (Aragao 1913), eine endgültige taxonomische Zuordnung war allerdings erst in den 1990er und 2000er Jahren nach zahlreichen Studien möglich. So konnten durch phylogenetische Nachweismethoden einige Eigenschaften nachgewiesen werden, die eine Zuordnung zum Reich der Pilze ermöglichten (Edman et al. 1988, Stringer et al. 1989a). Zum einen wurde eine starke Affinität der 16S ribosomalen RNA (16S rRNA) von *Pneumocystis carinii* mit der small subunit rRNA (16S-like rRNA) von *Ascomycota* nachgewiesen (Edman et al. 1988, Stringer et al. 1989a). Weiters konnten signifikante Parallelen zwischen fungalen DNA-Sequenzen und dem Gen, welches für die mitochondrial large subunit (mtLSU) von *Pneumocystis* kodiert (Sinclair et al. 1991), sowie weiteren sieben mitochondrialen Gensequenzen festgestellt werden (Pixley et al. 1991, Wakefield et al. 1992). Pilze benötigen für die Proteinsynthese einen zusätzlichen Elongationsfaktor (EF-3). Ein dem EF-3 von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* strukturell ähnliches Protein kann von einem Gen kodiert werden, welches in der RNA von *Pneumocystis* nachgewiesen wurde (Ypma-Wong et al. 1992). Analysen im Rahmen des „*Pneumocystis*-Genomprojekts“ zeigten, dass 68% der *P. carinii*-Transkripte Homologien zu fungalen Genen aufwiesen, besonders zu den Hefepilzen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie zu den filamentösen Pilzen *Aspergillus* und *Neurospora crassa* (Cushion und Smulian 2006).

Insgesamt bewiesen Genomanalysen die Zugehörigkeit der Spezies *Pneumocystis* zum Reich der Pilze, in enger Verwandtschaft zu den Abteilungen der Ascomycota und Basidiomycota (Wakefield et al. 1992, Wakefield 2002).

## 2.2. Wirtsspezifität und Charakteristika von *Pneumocystis*

Bis zur Erfindung des Elektronenmikroskops 1931 (Ruska und Knoll 1932) konnte lichtmikroskopisch mittels Grocott-Methenamin-Silberfärbung (GMS) und anderen Spezialfärbungen nur das Vorhandensein reifer Zystenstadien beurteilt werden. Diese entwickeln sich von einer dünnwandigen, mononukleären trophischen Form über drei aufeinanderfolgende sporozytische Stadien zu einer dickwandigen, 4-6 µm großen Zyste (*Ascus*) (Matsumoto und Yoshida 1984, Ramos Vara et al. 1998, Yoshida 1989). Multiple

Mitosen führen hierbei zur Bildung von acht Ascosporen (Matsumoto und Yoshida 1984), welche die Zyste durch eine Pore in der Zellwand verlassen und an Typ-1-Alveolarepithelzellen binden (Itatani 1994).

Mit einer Morbidität von 60-80% und einer Mortalität von schätzungsweise 20-25% (Dei-Cas 2000) weckte *Pneumocystis* als einer der häufigsten und gefährlichsten opportunistischen Infektionserreger bei HIV-Patienten besonders in den 1980er Jahren großes wissenschaftliches Interesse. Neben HIV spielen heutzutage auch andere immunsupprimierende Faktoren und Erkrankungen, wie beispielsweise Organtransplantationen, Autoimmunerkrankungen, immunsupprimierende Medikamente und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle (Calderón-Sandubete et al. 2002, Danesi et al. 2019, Hagler et al. 1987, Shiota et al. 1990)

Nachdem der Forschungsschwerpunkt vor allem auf den Auswirkungen eines Krankheitsausbruches durch bereits in der Lunge vorhandene Erreger lag und die epidemiologische Rolle von Tieren bei der Übertragung von *Pneumocystis* auf andere Tierarten und Menschen weitestgehend ungeklärt war, untersuchten chinesische Forscher Mitte der 90er Jahre die Folgen einer Infektion mit exogen zugeführten Pathogenen. Den untersuchten Katzen wurden hierfür in unterschiedlich hohen Konzentrationen aus Mäuselungen gewonnene *P. carinii*-Zysten inokuliert. Zusätzlich wurde den Tieren einer Testgruppe Cortison verabreicht, um eine Immunsuppression hervorzurufen. Bei der pathohistologischen Untersuchung der experimentell infizierten Tiere konnten Zysten im Lungengewebe aller Tiere nachgewiesen werden, klinisch zeigten Katzen mit geschwächtem Immunsystem ein reduziertes Allgemeinverhalten, Anorexie, Husten, Tachypnoe und Fieber (Yang et al. 1996). Eine Übertragung von *Pneumocystis* von Mäusen auf Katzen war also möglich, wobei nur Tiere mit geschwächtem Immunsystem eine klinische Erkrankung zeigten. Farrow et al. untersuchten 1972 eine mögliche Übertragung der Organismen von infizierten und klinisch erkrankten Dackeln auf Meerschweinchen, welche misslang. Auch die Besitzer der Hunde, welche in engem Kontakt mit den Tieren lebten, zeigten keine klinischen Symptome, weshalb eine Übertragung ausgeschlossen wurde (Farrow et al. 1972). Derartige Kreuzversuche unterstreichen die starke Anpassung an den Wirtsorganismus.

Auch auf molekularer Ebene lässt sich eine solche Anpassung nachweisen. Hierfür muss aber zunächst auf die Charakteristika dieser Erregergruppe eingegangen werden. Durch molekulare Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass der Genus *Pneumocystis* zahlreiche, hoch differenzierte taxonomische Einheiten vereint (Aliouat-Denis et al. 2008), welche sich an verschiedene Säugetier-Spezies anpassten und genetisch voneinander unterschieden (Mazars et al. 1997a, Mazars et al. 1997b). Genom-Sequenzierungen und phylogenetische Analysen von *P. carinii* der Ratte, *P. jirovecii* des Menschen und *P. murina* der Maus zeigten die Bildung eines Clusters mit *Taphrina deformans*, einer eng mit *Schizosaccharomyces* verwandten Pilzart. Zudem wurde festgestellt, dass die genannten Spezies über ein kleines Genom und ein reduziertes Genset verfügen (Ma et al. 2016). Weiters konnte im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Spezies nur eine Kopie der rRNA sowie wenig Transfer RNA (tRNA) Gene und ein geringer Gehalt der Nucleobasen Guanin und Cytosin nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften führen durch eine langsamere Transkription und Translation zu einem langsamen Wachstum des Pilzes (Fischer et al. 2006, Ma et al. 2016). Dies stellt in weiterer Folge eine mögliche Erklärung für die bisher nicht gelungene *in vitro* Anzucht dar (Cushion et al. 2021).

Besonders im Aufbau der Zellwand unterscheidet sich *Pneumocystis* gravierend von anderen Pilzen: in der Zellwand ist kein Chitin vorhanden, die flexible Zellwand der trophischen Form besteht aus Cholesterol an Stelle von Ergosterol und die stabile Zellwand der Zysten enthält  $\beta$ -Glucan, weshalb *Pneumocystis* für den Großteil antifungaler Wirkstoffe nicht empfänglich ist (Ito et al. 2000, Powles et al. 1998, Utili et al. 2007).  $\alpha$ -Glucan und N-Mannan-Moleküle mit spezifischen Seitenketten, die ein Erkennen durch das angeborene Immunsystem ermöglichen, fehlen bei beiden Formen (Ma et al. 2016). Durch die in der Zellwand vorhandenen  $\beta$ -Glucane können die Organismen mit Calcofluor, Ortho-Toluidinblau, Periodic Acid-Schiff Reaktion oder Grocott-Methenamin sowie weiteren Silberfärbungen angefärbt werden (Dei-Cas et al. 2006).

Zur Energiegewinnung wird oxidative Phosphorylierung genutzt, da andere Stoffwechselprozesse hochgradig reduziert sind und Enzyme für Glycosylierung, Gluconeogenese und Pyruvatgärung teilweise fehlen. Nachdem auch Transporter und Rezeptoren für zahlreiche Metaboliten fehlen, scheint Endozytose zur Nährstoffaufnahme zu dienen (Ma et al. 2016).

Ein besonderes Alleinstellungsmerkmal und wichtiges Charakteristikum von *Pneumocystis* stellen die Major surface glycoprotein (Msg)-Gen-Familien dar. Diese kodieren für die Zelloberfläche benötigte Glykoproteine und spielen eine wichtige Rolle für die Pathobiologie von *Pneumocystis*. Man geht davon aus, dass Msg eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen spielt und das Umgehen von Immunantworten der Wirtszellen durch antigenetische Variation erleichtert (Ma et al. 2016). Sie nehmen mit 3-6% einen großen Teil des *Pneumocystis*-Genoms ein, wo hingegen die Anzahl an Genen die für Transport, Transkriptionsfaktoren und Enzyme kodieren, stark reduziert ist (Ma et al. 2016). Die Msg lassen sich weiters in fünf Gen-Familien namens Msg-A, Msg-B, Msg-C, Msg-D und Msg-E einteilen und unterscheiden sich in der Anzahl weiterer Untergruppen, ihrer Verteilung unter den verschiedenen *Pneumocystis*-Spezies, den Sequenzen und ihren Expressionskontrollmechanismen.

Man geht davon aus, dass Msg eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Wirt und Pathogen spielen und das Umgehen von Immunantworten der Wirtszellen durch antigenetische Variation erleichtern (Ma et al. 2016). Ma et al. untersuchten 2020 die Charakteristika und phylogenetische Verwandtschaft der Msg-Domänen, wobei neun konservierte Domänen identifiziert werden konnten. Es finden sich also an neun verschiedenen Stellen des Msg-Gens in allen *Pneumocystis*-Arten sehr ähnliche Sequenzen (Ma et al. 2020). Klassische Msg-Proteine (Msg-A1) enthalten fünf Domänen, die vermutlich durch Genduplikation entstanden. Diese Domänen formen unabhängig vom Ursprung der Spezies der Domäne eigene Cluster, was zu der Vermutung führt, dass der phylogenetisch jüngste gemeinsame Vorfahre bereits diese Strukturen aufwies. Folglich entwickelten sich die Domänen ohne weitere Duplikation oder Rekombination unter den Domänen innerhalb derselben, aber auch zwischen den Spezies. Innerhalb der fünf Msg-A-Domänen bildeten sich jedoch auch speziesspezifische Cluster, was eine Weiterentwicklung der Msg-Familie nach Auftrennung in die einzelnen *Pneumocystis*-Spezies nahelegt. Zusätzlich bilden *P. carinii* und *P. murina* zwei separate Cluster, von denen jeder beide Spezies enthält, was die Annahme untermauert, dass die beiden Cluster vor der Trennung der Spezies entstanden sein müssen (Ma et al. 2016).

Eine weitere Besonderheit der Msg-A-Familie stellt der Expressionskontrollmechanismus der Subfamilie Msg-A1 dar. Bestimmte Msg-A1-Gene (Msg-A1) werden nur exprimiert, wenn

sie an eine sogenannte Upstream Conserved Sequence (UCS) gekoppelt sind (Edman et al. 1996). Eine UCS konnte in Sequenzen von *P. murina*, *P. carinii*, *P. wakefieldiae* und *P. jirovecii* nachgewiesen werden und wurde später auch bei *Pneumocystis*-Spezies detektiert, welche Rhesusäffchen, Hunde, Hasen und verschiedene Rattenspezies infizieren (Edman et al. 1996, Ma et al. 2020). Zwischen den UCS der genannten *Pneumocystis*-Spezies konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die UCS aller untersuchten Tierarten zeigten dieselbe Sequenzorganisation und beinhalteten zwei Exons, die durch ein in der Größe variierendes Intron unterbrochen werden. Exon 1 war bei allen UCS gleich lang, wohingegen Exon 2 stark in der Größe variierte. Das kürzeste Exon 2 mit 230 Basenpaaren (bp) konnte bei *P. oryctolagi*, das längste mit 314 bp bei *P. murina* nachgewiesen werden. Auch die Introns wiesen eine Variabilität in der Größe auf, wobei *P. carinii* das kürzeste (150 bp) und *P. oryctolagi* (515 bp) das längste Intron besaß. Die Länge der UCS-Protein-Sequenzen unterschied sich und lag zwischen 110 und 138 Aminosäuren. Die Übereinstimmung der Sequenzen variierte zwischen 24 und 97%. Phylogenetische Untersuchungen zeigten außerdem, dass die UCS von nagerspezifischen *Pneumocystis* spp. Merkmale aufwiesen, die jenen von anderen Säugetieren fehlten. Zudem zeigen die verschiedenen Spezies (*P. carinii*, *P. wakefieldiae*, und *P. oryctolagi*) einen unterschiedlichen Grad an Sequenzvariationen, wobei *P. oryctolagi* die höchste Variation aufwies (Ma et al. 2020).

### **2.3. Klinik, Immunreaktion, Prophylaxe und Therapie**

Zavala und Rosado untersuchten 1972 die Verbreitung von *Pneumocystis* spp. in den Katzenpopulationen der Städte Mexiko und Yukatan. Mittels Giemsa-Färbung von Lungenproben konnten in Mexiko Stadt bei 4% und in Yucatan bei 12,3% der untersuchten Katzen *Pneumocystis*-Zysten nachgewiesen werden (Zavala und Rosado 1972). Eine ähnliche Erhebung der Prävalenz von *Pneumocystis*-Infektionen bei Katzen führten Settnes und Hasselager in Dänemark durch. Bei weniger als einem Prozent der untersuchten Gewebeproben konnte *Pneumocystis* histologisch in der Toluidinblau-Färbung (TBO) festgestellt werden. Da die für die Studie ausgewählten Tiere keine klinischen Symptome einer Pneumozystose aufwiesen, kam man zu der Annahme, dass Katzen möglicherweise als Erreger-Reservoir fungieren (Settnes und Hasselager 1984).

Da bereits aus der Humanmedizin bekannt war, dass eine Infektion zwar bei allen Individuen möglich ist, eine Proliferation und damit eine klinische Pneumozystose aber eine Immunsuppression voraussetzen und daher Individuen mit geschwächtem Immunsystem besonders häufig klinische Symptome entwickeln, stellte sich die Frage, ob dies auch auf Katzen zutrifft. Hierfür wurden Lungengewebsproben von mit felinem Leukämievirus (FeLV) infizierten (Hagler et al. 1987) sowie mit Corticosteroiden behandelten Katzen (Shiota et al. 1990) mit einer Gomori-Versilberung histologisch auf das Vorkommen von *Pneumocystis*-Zysten untersucht. Bei den an FeLV erkrankten Katzen konnte der Erreger nicht detektiert und somit als Komplikation einer FeLV-Infektion sowie als Ursache letaler interstitieller Pneumonien bei Katzen ausgeschlossen werden (Hagler et al. 1987). Diese Hypothese bestätigten auch die Ergebnisse der Studie von Shiota et al., da unabhängig von der Therapiedauer 70% der mit Corticosteroiden behandelten Katzen histologisch nur eine leichte Infektion zeigten (Shiota et al. 1990).

Da bisher keine spontane Erkrankung bei Katzen mit klinischer Symptomatik bekannt ist und ein Großteil der publizierten Studien auf eine latente Infektion von Katzen hinweisen, kann hier nur auf Symptome und Pneumonieformen eingegangen werden, welche die Tiere bei einer experimentellen Infektion zeigten.

Katzen, die experimentell mit *Pneumocystis* infiziert wurden, zeigten nach einer Immunsuppression durch die Gabe von Glukokortikoiden ein vermindertes Allgemeinverhalten, Anorexie, Husten, Tachypnoe und Fieber. Zudem konnte festgestellt werden, dass nicht die Menge an inokulierten Zysten, sondern der Immunstatus der Tiere ausschlaggebend für die Ausprägung klinischer Symptome war (Yang et al. 1996). In den postmortalen pathoanatomischen und -histologischen Untersuchungen zeigten die Tiere Lungenschwellung, Epithelhyperplasie, interstitielle Pneumonie sowie mit schaumartigem Exsudat gefüllte Alveolen, Bronchien und Bronchioli (Shiota et al. 1990, Yang et al. 1996).

Im Gegensatz zu Katzen konnten bei Hunden bereits spontane Erkrankungen mit klinischer Symptomatik festgestellt werden. Besonders häufig betroffen waren Zwergdackel (Lobetti et al. 1996, Lobetti 2000, McCully et al. 1979) und Cavalier King Charles Spaniel (Ramsey et al. 1997, Watson et al. 2006). Da Zwergdackel für eine B- und T-Zell assoziierte Immunsuppression prädisponiert sind, entwickeln sie folglich hochgradige Infektionen des

Respirationstrakts. Eine ähnliche Beeinträchtigung des Immunsystems wird bei Cavalier King Charles Spaniels vermutet, konnte bisher allerdings nicht bewiesen werden (Lobetti 2000, Watson et al. 2006). Auch andere Hunderassen ohne genetische Prädisposition, wie beispielsweise Yorkshire Terrier (Cabañes et al. 2000), Deutscher Schäferhund (Sedlmeier und Dahme 1955), Beagle und zahlreiche andere Rassen (Weissenbacher-Lang et al. 2018) waren betroffen, das Auftreten klinischer Symptome wurde in diesen Fällen allerdings auf eine Schwächung des Immunsystems durch vorhergehende Erkrankungen wie Demodikose (Watson et al. 2006), chronische Diarrhoe (Farrow et al. 1972) oder andere chronische respiratorische Erkrankungen (Cabañes et al. 2000) zurückgeführt. Obwohl die Erkrankung bei Hunden verschiedenen Alters nachgewiesen wurde, wird angenommen, dass eine Infektion vor allem bei Junghunden auftritt (Farrow et al. 1972, Lobetti et al. 1996, Lobetti 2000, Weissenbacher-Lang et al. 2018).

Trotz des seltenen Auftretens einer klinisch apparenten kaninen Pneumozystose ist die Erkrankung von schwerer Symptomatik und einer sehr geringen Überlebensrate geprägt (Cabañes et al. 2000, Farrow et al. 1972, Settnes und Hasselager 1984, Weissenbacher-Lang et al. 2018). Bei spontan erkrankten Tieren wurden besonders unspezifische Symptome wie Anorexie, Gewichtsverlust trotz normaler Futteraufnahme, und Leistungsintoleranz regelmäßig beobachtet (Weissenbacher-Lang et al. 2018). Nur vereinzelt lag eine erhöhte innere Körpertemperatur vor. Mit dem Respirationstrakt assoziierte Symptome inkludieren chronischen, nicht-produktiven Husten, Dyspnoe, Tachypnoe, verschärfte Lungengeräusche in der Auskultation, Tachykardie, und je nach Schweregrad der respiratorischen Störungen Zyanose (Cabañes et al. 2000, Ramsey et al. 1997, Weissenbacher-Lang et al. 2018). Vorhergehende antibiotische und antiinflammatorische Behandlungen waren meist erfolglos oder führten nur zu einer temporären Linderung (Cabañes et al. 2000).

Labordiagnostisch konnten Leukopenie, Lymphopenie, Neutropenie und Monozytose nachgewiesen werden (Cabañes et al. 2000, Ramsey et al. 1997), allerdings sind diese Parameter sehr unspezifisch für die Diagnosestellung einer Pneumozystose. Als diagnostisch hilfreich könnte sich die Hypoglobulinämie erweisen (Watson et al. 2006, Weissenbacher-Lang et al. 2018).

Bildgebende Verfahren sind aufgrund der inhomogenen Befunde diagnostisch unspezifisch, leisten aber einen wichtigen Beitrag zur Diagnostik von in der Humanmedizin beschriebenen

Komplikationen wie Pneumothorax und Pneumomediastinum (Cheng et al. 2014, Chow et al. 1993, Eng et al. 1987, Hosoda und Sakamoto 2019, Saleem et al. 2016, Sherman et al. 1986, Suwanwongse und Shabarek 2020, Yee et al. 2020), welche auch beim Hund auftreten können (Ramsey et al. 1997, Weissenbacher-Lang et al. 2018, Weissenbacher-Lang et al. 2017b). In der Sektion wurden bei den untersuchten Tieren meist ähnliche Veränderungen festgestellt. Die Lungen wurden als fest, verfärbt und gummiartig dargestellt (Farrow et al. 1972, Ramsey et al. 1997). Besonders schwere Veränderungen beschrieben Weissenbacher-Lang et al. (2017) bei einem Whippet-Mischlingshund. Das Lungengewebe zeigte neben den für *Pneumocystis* typischen histologischen Befunden wie interstitieller Pneumonie mit Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen und mit eosinophilen, schaumigen, kugelförmigen Strukturen gefüllten Alveolen hochgradige Veränderungen der Lungenarchitektur, perivaskuläre Manschetten sowie moderate, multifokale Blutungen im Lungenparenchym. Ein im CT darstellbares Pneumomediastinum und ein Axillaremphysem komplettierten die zahlreichen Veränderungen im Respirationstrakt. Auch in den mediastinalen und sternalen Lymphknoten konnten neben dem Erreger hochgradige Veränderungen der Gewebsarchitektur sowie Lymphozytendepletion und Blutresorption festgestellt werden (Weissenbacher-Lang et al. 2017a).

Die Reaktion des Wirtsorganismus auf eine *Pneumocystis*-Infektion stellt ein Zusammenspiel verschiedener humoraler und zellulärer Immunmechanismen dar, in deren Zentrum die T-Helferzellen stehen. Die CD4-positiven T-Zellen (CD4+) nehmen hierbei neben der Regulation der Zytokinproduktion (Dubin und Kolls 2008) eine zentrale Rolle in der Bekämpfung des Pilzes ein (Phair et al. 1990). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, in Studien konnte jedoch festgestellt werden, dass ein Mangel an kostimulatorischen Molekülen bei normaler Anzahl an T-Zellen, ein Mangel an CD4+ T-Zellen oder deren komplette Abwesenheit, wie sie bei einer Immunsuppression vorliegt, zu einer erhöhten Anfälligkeit für *Pneumocystis*-Pneumonien führt (Beck et al. 2003, Mansharamani et al. 2000, Phair et al. 1990, Rose et al. 2006). In Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass Individuen bei einer alleinigen Depletion von CD4+ T-Zellen eine geringere Pilzkonzentration aufwiesen als bei einem Mangel an CD4+ und CD8+ T-Zellen (Beck et al. 1996). Dieser partiell protektive Effekt geht auf die hohe Anzahl dieser Zellen im Lungengewebe bei einer Pneumozystose mit vorhergehender CD4+ Depletion (Beck et al. 1991) sowie auf die T zytotoxischen Typ 1

CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurück, welche ein durch Makrophagen vermitteltes Abtöten der Organismen fördern. Im Gegensatz hierzu stehen die T zytotoxischen Typ 2 CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche mit pathologischen Veränderungen des Lungengewebes assoziiert werden (Wright et al. 1999, Wright et al. 2001). IgM-Antikörper, produziert von B-1 Zellen, tragen weiters zu einer frühen Verteidigung gegen die Infektion bei (Rapaka et al. 2010).

Eine sofortige Behandlung ist, besonders bei der kaninen Pneumozystose, essenziell für eine vollständige Genesung. Antimykotische Wirkstoffe mit weitem Wirkspektrum wie Ketokonazol oder Amphotericin B sind aufgrund des besonderen Aufbaus der Zellwand von *Pneumocystis spp.* gegen diesen Pilz unwirksam (Hughes 1989, Schmatz et al. 1990). Nach dem Einsatz von 1,3  $\beta$ -Glucan Synthese Inhibitoren aus der Familie der Echinocandine und der Papulacandine hingegen erfolgte eine rasche Elimination der adulten Erregerstadien (Schmatz et al. 1990). Als besonders wirksam hat sich Trimethoprim-Sulfonamid erwiesen, die Überlebensrate bei Hunden lag in einer Metaanalyse von publizierten Fällen bei einem Durchschnitt von ca. 65% (Weissenbacher-Lang et al. 2018). Da eine Erkrankung des Respirationstrakts und die Letalität eher mit dem Ausmaß und der Intensität der entzündlichen Veränderungen des Lungengewebes zusammenhängen als mit der Erregerlast (Limper und Merali 2003), ist bei schweren Fällen die Verabreichung einer Kombination aus antimikrobiellen und antiinflammatorischen Wirkstoffen angezeigt (Moon et al. 2011). Die Dosierung der Glukokortikoide sollte hierbei sehr niedrig ausfallen, um ein weiteres Wachstum des Pilzes zu verhindern (Anonymous 1990). Patient:innen profitieren besonders von deren Wirkung, sofern die Gabe innerhalb von 72 Stunden nach Therapiebeginn erfolgt (European AIDS Clinical Society 2021). Zur Therapie moderater bis schwerer *Pneumocystis*-Erkrankungen bei HIV-positiven Personen empfiehlt die European AIDS Clinical Society (EACS) folgendes Therapieschema: Mindestens 21 Tage lang dreimal täglich (TID) 5 mg/kg Trimethoprim in Kombination mit 25 mg/kg Sulfonamid, i. v. oder p. o. sowie die Gabe von Prednison. An Tag 1 bis 5 werden zweimal täglich (BID) 40 mg Prednison p. o. verabreicht, an den Tagen 6 bis 10 viermal täglich (QID). Die Dosis wird nun auf 20 mg halbiert und für zehn weitere Tage verabreicht (European AIDS Clinical Society 2021). Im Gegensatz zur Humanmedizin gibt es in der Tiermedizin keine einheitliche Dosierung für Glukokortikoide bei einer *Pneumocystis*-Erkrankung, da bisher sehr wenige Studien vorliegen und die

Dosierungen, besonders bei Hunden, sehr inhomogen ausfielen (Sukura et al. 1996, Watson et al. 2006, Weissenbacher-Lang et al. 2017a). Eine unterstützende, symptomatische Therapie in Form einer exogenen Sauerstoffzufuhr oder assistierter Ventilation ist aufgrund des gestörten alveolären Gasaustausches von besonderer Bedeutung, weiters können Bronchodilatoren unterstützend wirken (Lobetti 2006).

Ein Schutz vor einer *Pneumocystis*-Infektion ist, sowohl bei gesunden als auch immunsupprimierten Individuen, möglicherweise durch eine aktive Immunisierung erreichbar. Experimentell konnte ein Antikörper-vermittelter Schutz gegen *Pneumocystis* sowohl durch eine passive als auch eine aktive Immunisierung demonstriert werden (Bartlett et al. 1998, Gigliotti et al. 2002, Roths und Sidman 1993). Eine experimentelle, aktive Immunisierung führte bei Mäusen zu hohen Antikörpertitern und CD4<sup>+</sup> T Zell-Depletion, sowie einem Schutz vor einer (experimentellen) Infektion mit *P. carinii* (Harmsen et al. 1995). Um die Entwicklung eines Impfstoffes vorantreiben zu können, müssen zunächst die spezifischen protektiven Antigene definiert werden. Msp ist hierzu aufgrund seiner hohen antigenetischen Variabilität nicht geeignet (Stringer und Keely 2001). Kex1, eine vermutlich intrazelluläre, bei *Pneumocystis* vorkommende Protease (Lee et al. 2000), und ein verwandtes Antigen (Gigliotti et al. 1998, Lee et al. 2000) erwiesen sich experimentell besonders durch ihre hohe Produktion an Anti-*Pneumocystis*-IgG-Titern als geeignet (Wells et al. 2006, Zheng et al. 2005). Besonders für immunsupprimierte Individuen mit einer *Pneumocystis*-Koinfektion spielt die Höhe der Antikörpertiter möglicherweise eine wichtige Rolle (Kling et al. 2009, Kling et al. 2010), da diese nachweislich mit dem Schutz vor einer *Pneumocystis*-Infektion nach Immunsuppression und experimenteller Infektion mit *Pneumocystis* korrelieren (Kling et al. 2010).

Im Allgemeinen könnte sich eine Impfprophylaxe vor allem in der Humanmedizin, besonders bei HIV-Infektionen oder langwierigen Tumorerkrankungen sowie weiteren immunsupprimierenden Umständen in Zukunft als Prophylaxe durchsetzen (Morris und Norris 2012). Aufgrund der oben beschriebenen, noch nicht etablierten Immunisierung und des bei Katzen seltenen Vorkommens einer klinischen Pneumozystose stellt sich die Frage nach der Sinnhaftigkeit einer Infektionsprophylaxe bei dieser Spezies.

## 2.4. Nachweismethoden

Als Standardmethode zum Nachweis von *Pneumocystis* spp. hat sich seit der Entdeckung des Pilzes zunächst die histologische Untersuchung der Lungenproben mittels Spezialfärbungen wie der Grocott-Methenamin-Silberfärbung, Giemsa- oder Toluidinblau-O-Färbung etabliert. Hierbei werden Polysaccharide der Zellwand angefärbt, was zwar die Detektion von Pilzen ermöglicht, jedoch eine Differenzierung verschiedener Pilze und deren Entwicklungsstadien erschwert (Jensen et al. 2001).

Methoden, die die Markierung des Erregers direkt am histologischen Schnittpräparat erlauben, wie die ISH, die Fluoreszenz-ISH (FISH) und die Immunhistochemie (IHC), haben den Vorteil gegenüber anderen molekularen Techniken, dass das Vorhandensein von *Pneumocystis* spp. mit den histologisch beschriebenen Lungenläsionen korreliert werden kann. In hochgradigen Fällen konnten Binanti et al. (2014) *Pneumocystis*-Aggregate beim Schwein sogar bereits in H&E-gefärbten Gewebeschnitten nachweisen. Die in der ISH detektierten violetten bis schwarz-braunen Signale stellten sich in der H&E-Färbung als honigwabenartige, schaumige, eosinophile Aggregate in den Alveolarlumina dar (Binanti et al. 2014). Durch Untersuchungen wie diese konnten bereits einige tierartige Unterschiede bezüglich der Erregerkonzentration und -Verbreitung sowie den assoziierten Lungenläsionen erkannt werden. So zeigte sich unter anderem, dass beim Hund auch extrapulmonale Pneumozystosen vorkommen können. Bei einem Whippet-Mischling konnten neben hochgradigen Veränderungen der Lungenstruktur freie oder von Makrophagen phagozytierte *Pneumocystis*-Stadien in den Alveolen sowie im Lymphknoten detektiert werden (Weissenbacher-Lang et al. 2017a). Auch bei experimentell infizierten Katzen konnte man – allerdings mittels GMS-Färbung – eine Ausbreitung des Pilzes in verschiedene Organe feststellen, die Tiere zeigten einen unterschiedlichen Ausprägungsgrad der Pneumonien (Yang et al. 1996). Im Gegensatz zum Hund war die *Pneumocystis*-Pneumonie beim Schwein nur mit geringgradigen Lungenläsionen im Sinne einer interstitiellen oder granulomatösen Pneumonie vergesellschaftet (Weissenbacher-Lang et al. 2016).

Die indirekte Immunfluoreszenz lieferte im Vergleich zu anderen molekularen Techniken ähnlich gute Ergebnisse (Tamburrini et al. 1993).

Mit der Weiterentwicklung diagnostischer Methoden veränderte sich auch das Probenmaterial und die Forschung an *Pneumocystis spp.* erfuhr einen Aufschwung (Tamburrini et al. 1993). Nun wurden vermehrt Brochoalveolarlavage-Flüssigkeit (BALF) und Speichel auf den Pilz untersucht, welcher 1990 erstmals durch Wakefield et al. mittels PCR nachgewiesen werden konnte (Wakefield et al. 1990, Wakefield et al. 1993). Ein Forschungsteam um Patrizia Danesi untersuchte 2019, ob der Erreger mittels nested PCR und Real-time-PCR im Lungengewebe verstorbener, chronisch erkrankter und in der BALF lebender Katzen mit Atemwegssymptomatik nachweisbar war. Bei 29% der Katzen konnte *Pneumocystis*-DNA trotz fehlender histologischer Veränderungen des Lungengewebes in diesem detektiert werden, sämtliche BALF-Untersuchungen führten jedoch zu einem negativen Ergebnis (Danesi et al. 2019).

### 3. Material

Um das Vorkommen von *Pneumocystis* bei Katzen genauer zu eruieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit retrospektiv 76 formalinfixierte und paraffineingebettete Lungenproben aus der Familie der Felidae, welche aus dem Archiv des Instituts für Pathologie stammen, histologisch sowie mittels *In situ*-Hybridisierung (ISH) untersucht. Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um für die Routinediagnostik eingeschickte Proben aus den Jahren 1997-2020. Die Tiere wurden, wie in der nachfolgenden Tab. 1 ersichtlich, nach Unterfamilie, Gattung und Art eingeteilt:

**Tab. 1:** Anzahl der Proben (n) pro Unterfamilie, Gattung und Art

<b>Großkatzen</b>		<b>Kleinkatzen</b>					
<b>Pantherartige (n=13)</b>		<b>Echte Katzen (n=53)</b>		<b>Luchse (n=7)</b>		<b>Pumas (n=3)</b>	
Tierart	n	Tierart	n	Tierart	n	Tierart	n
Löwen ( <i>Panthera leo</i> )	6	Hauskatze ( <i>Felis catus</i> )	46	Eurasischer Luchs ( <i>Lynx lynx</i> )	7	Puma ( <i>Puma concolor</i> )	3
Tiger ( <i>Panthera tigris</i> )	6	Europäische Wildkatze ( <i>Felis silvestris</i> )	7				
Leoparden ( <i>Panthera pardus</i> )	1						

## **4. Methoden**

### **4.1. Herstellung histologischer Schnitte aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Material mittels Schlittenmikrotom**

Da Lungengewebe und das dieses umgebende Paraffin unterschiedlich hart sind, wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden auf eine Kühlplatte gelegt, um eine ähnliche Härte, einen Zusammenhalt der beiden Komponenten und somit eine gute Schnittqualität zu erreichen. Währenddessen wurde der Arbeitsplatz vorbereitet. Hierbei wurde ein Wasserbad mit entmineralisiertem Wasser (WEK-Wasser) befüllt und auf 45 °C vorgeheizt. Daneben wurde ein kleineres kaltes Wasserbad bereitgestellt und das Filterpapier darin befeuchtet. Nachdem alles vorbereitet wurde, konnte mit dem Schneiden begonnen werden. Zunächst wurde der Paraffinblock in die Kassettenklammer des Mikrotoms (Microm HM 400, Thermo Scientific) eingespannt und der Schlitten, zu welchem die Messerhalterung und Klinge gehören, langsam an den Block geführt. Im nächsten Schritt musste der Block getrimmt werden, um eine ebene Fläche zu schaffen und das Gewebe soweit offenzulegen, dass ein repräsentativer Schnitt erzeugt werden konnte. Hierbei wurden pro Schlittenzug zwischen 10 und 20 µm Material abgetragen. Anschließend wurde die Oberfläche durch mehrere 2 µm dicke Schnitte vollständig geglättet. Durch gleichmäßige, langsame Schneidebewegungen konnten nun circa 2 µm dicke Schnitte gewonnen werden. Um einer Gewebekomprimierung oder einem Einrollen der Schnitte entgegenzuwirken, konnte der Schnitt leicht von unten angeblasen werden, wodurch das bereits geschnittene Material leicht vom Mikrotom abgehoben war und seltener hängen blieb. Der angefertigte Schnitt wurde anschließend mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig von der Klinge gelöst und in das kalte Wasserbad gelegt, welches sauber und frei von Luftblasen und Schnittresten war. Durch vorsichtige Bewegungen konnte der Schnitt nun unter Zuhilfenahme von Pinseln gegebenenfalls auseinandergerollt werden und auf einen Objektträger gelegt werden. Mit diesem wurden die Schnitte in das warme Wasserbad verbracht, wo sie sich auf ihre ursprüngliche Größe ausdehnten. Um eine zu starke Ausdehnung des Gewebes zu verhindern, wurden die Schnitte schnellstmöglich wieder aus dem Bad genommen. Die vollständig gestreckten Schnitte wurden senkrecht aus dem Wasser auf die Objektträger gezogen, überschüssiges Wasser abgetropft, mit dem angefeuchteten

Filterpapier abgepresst, beschriftet und kurz zum Trocknen auf den Rand des Wasserbads gelegt.

Da von jeder Gewebeprobe eine Hämotoxylin & Eosin (H&E)-Färbung sowie eine ISH angefertigt werden sollten, mussten stets zwei Schnitte hergestellt werden, wofür unterschiedliche Objektträger benötigt wurden. Die angefertigten Schnitte für die H&E-Färbung wurden auf unbeschichtete (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) und die für die ISH bestimmten Schnitte auf beschichtete Objektträger (Super Frost® Plus) aufgezogen. Anschließend wurden die Objektträger bei 60 °C für eine Stunde getrocknet.

#### **4.2. *In situ*-Hybridisierung**

Die Durchführung einer ISH ermöglicht den direkten Nukleinsäure-Nachweis eines Pathogens, in diesem Fall *Pneumocystis* spp., am Paraffinschnitt mittels eines Digoxigenin-markierten Oligonukleotids, welches als Sonde bezeichnet wird. Das Detektionssystem besteht aus einem Anti-Digoxigenin-Antikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, das einen enzymatischen Farbumschlag des in weiterer Folge aufgetragenen Chromogens bewirkt. Die Auswertung der schwarz-violetten Signale erfolgt mit dem Lichtmikroskop. Das Verfahren ermöglicht den Erregernachweis auf subzellulärer Ebene, die Semiquantifizierung und die Korrelation des Erregers mit pathohistologischen Läsionen.

Die Durchführung der Methode dauert zwei Tage. Den ersten Arbeitsschritt stellte das Entparaffinieren mit (R)-(+)-Limonen ((R)-(+)-Limonen zur Synthese, Merck, Wien, Österreich) der bereits angefertigten Schnitte und das Rehydrieren in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100%, 1x 96%, 1x 70%) dar. Währenddessen wurde eine Proteolyselösung aus Aqua destillata (Aqua dest.), Tris-Puffer 0,5 M pH 7,4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Proteinase K (2,5 µg/mL; Roche, Wien, Österreich) hergestellt und in einer Küvette im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Nach dem Rehydrieren wurden die Schnitte in diese Lösung verbracht und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dadurch wurde die Nukleinsäure freigelegt. Nach der erfolgten Proteolyse wurden die Objektträger einzeln zweimal in entsalztem Wasser gespült, kurz in 96%igen Alkohol getaucht und für 5 Minuten in 100%igen Alkohol gestellt. Anschließend wurden die Objektträger auf einer dunklen Unterlage luftgetrocknet. Damit die in weiterer Folge aufgetragenen Lösungen nicht vom Objektträger

tropfen, wurden mit einem Fettstift (ImmEdge Hydrophobic Barrier PAP Pen, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) an den Enden der Objektträger nahe der Lungenproben Linien gezogen, die im weiteren Verlauf als Barriere dienen.

Danach erfolgte die eigentliche Hybridisierung, bei welcher sich die Sonde an der Zielsequenz anlagert. Hierfür wurden während der Proteolyse zwei Lösungen vorbereitet, Lösung 1, bestehend aus Heringssperma-DNA (Merck, Darmstadt, Deutschland), Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und der Oligo-Sonde (lokalisiert am 18S rRNA-Gen, Länge 40 bp, Sequenz: 5'-gga acc cga aga ctt tga ttt ctc ata aga tgc cga gcg a-3', Microsynth AG, Wien, Österreich) sowie Lösung 2 aus Formamid (Merck, Darmstadt, Deutschland), SSC 20x, Denhardt 50x (VWR, Wien, Österreich), Dextransulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Aqua dest. Die beiden Lösungen wurden kurz vor Gebrauch vermischt und anschließend auf den Objektträgern verteilt. Diese kamen im Anschluss auf einer Metalltasse für 6 Minuten in ein 96 °C heißes Wasserbad und wurden anschließend für einige Minuten auf Eis gestellt. Dies diente der Denaturierung der Nukleinsäure. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei ca. 40 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Objektträger aus der Feuchtkammer genommen, die Hybridisierungslösung entfernt und Stringenzwaschungen durchgeführt, welche der Entfernung nicht oder ungebundener Sondenmoleküle dienen. Hierfür wurden die Objektträger jeweils 10 Minuten in Kochsalz-Natriumzitat-Lösung (Saline Sodium Citrate, SSC) in drei verschiedenen Konzentrationen (SSC 2x, SSC 1x und SSC 0,1x) verbracht. Um die nun mit Digoxigenin markierten Hybride sichtbar zu machen, wurden die Schnitte im nächsten Schritt mit einem Äquilibrierungspuffer, der einen gegen die Sonde gerichteten Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP; Verdünnung 1:200; Roche, Wien, Österreich) enthielt, für ca. 60 Minuten inkubiert. Nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper wurden im Anschluss durch zwei 15minütige Waschungen mit Puffer I (1x) und dem anschließenden Einstellen in Puffer III entfernt.

Mithilfe eines Farbreagens bestehend aus Puffer III, 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP; Roche, Wien, Österreich), Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT; Roche, Wien, Österreich) und Levamisol (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde der spezifisch gebundenen Antikörper nach einstündiger Inkubation der Schnitte in der feuchten Kammer sichtbar gemacht.

Es wurde bei jedem Durchgang eine Positivkontrolle für *Pneumocystis spp.* mitgeführt, anhand welcher auch überprüft werden konnte, ob die Signalintensität bereits ausreichte. Die Reaktion wurde mit TE-Puffer (1x) pH 8,0 gestoppt. Danach erfolgte die Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt, Deutschland), welches anschließend abgespült wurde. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### 4.3. Hämatoxylin & Eosin-Färbung

Zu Beginn wurden die Schnitte getrocknet, entparaffiniert und mittels einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert. Die eigentliche Färbung erfolgte danach durch 10minütiges Einstellen in Hämatoxylin nach Ehrlich (Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach dem Abspülen der Färbelösung mit Leitungswasser, dem Differenzieren in HCl-Alkohol und 10minütigem, fließendem Wässern in Aqua. dest. erfolgte die Färbung mit Eosin (0,5-1 %; Merck, Darmstadt, Deutschland). Hierbei wurden die Objektträger kurz in das Färbemittel getaucht und mit Leitungswasser abgespült. Im Anschluss erfolgte eine Dehydrierung der Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe, eine Überführung in (R)-(+)-Limonen ((R)-(+)-Limonen zur Synthese, Merck, Darmstadt, Deutschland) und abschließend das Eindecken mit Eukitt® (Sigma-Aldrich, Wien, Österreich).

#### 4.4. Beurteilung der hergestellten ISH-Schnittpräparate

Die Auswertung der H&E gefärbten Lungengewebsproben sowie der ISH-Signale erfolgte lichtmikroskopisch.

Die Abstufung des Vorkommens der Mikroorganismen im ISH-Schnittpräparat erfolgte nach dem Beurteilungsschema von Jensen et al. (2001):

- (+) – Geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis spp.*  
(Vereinzelte Mikroorganismen im Lungenparenchym)

- + – Geringgradiges Auftreten von *Pneumocystis spp.*  
(Einzelnen oder in Gruppen an die Alveolarwände angelagerte Organismen)
  
- ++ – Mittelgradiges Auftreten von *Pneumocystis spp.*  
(Diffus verteilte Gruppen oder einzelne größere Aggregate von Organismen)
  
- +++ – Hochgradiges Auftreten von *Pneumocystis spp.*  
(Kontinuierliche Auskleidung des Alveolarepithels über größere Bereiche bis hin zu kompletter Füllung der Alveolen)

Mittels H&E-Färbung wurden die histologischen Läsionen der Lungengewebsproben analysiert. Um eine mögliche Korrelation des Vorliegens verschiedener Lungenläsionen mit dem Vorhandensein von *Pneumocystis spp.* darzustellen, wurden die Ergebnisse der H&E Färbung und der ISH zusammengeführt. Im Rahmen der Routinediagnostik wurden bereits vorhandene Vorerkrankungen unterschiedlicher Ätiologie, welche im Zusammenhang mit einer Pneumozystose stehen könnten, erfasst und untersucht.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Ergebnisse der ISH

Fünf (n) der insgesamt 76 Lungengewebssproben zeigten in der Auswertung ein positives Signal für *Pneumocystis* spp. Dies entspricht einem Anteil von 6,6%. Alle *Pneumocystis* spp.-positiven Tiere gehören der Familie der Hauskatzen an. Bei vier der insgesamt fünf (n) positiven Tiere konnten eine geringstgradige, bei einem Tier (n) eine geringgradige *Pneumocystis* spp.-Konzentration nachgewiesen werden.

In Tab. 2 sind die semiquantitativen Ergebnisse der ISH tabellarisch aufgeführt.

**Tab. 2:** Anzahl der *Pneumocystis*-positiven und -negativen Lungengewebssproben sowie semiquantitative ISH-Ergebnisse

	Großkatzen (n = 13)			Kleinkatzen (n = 63)			
	Löwe (n = 6)	Tiger (n = 6)	Panther (n = 1)	Hauskatze (n = 46)	Europ. Wildkatze (n = 7)	Euras. Luchs (n = 7)	Puma (n = 3)
N (n)	6	6	1	41	7	7	3
P (n)	-	-	-	5	-	-	-
(+) (n)	-	-	-	4	-	-	-
+ (n)	-	-	-	1	-	-	-
++ (n)	-	-	-	-	-	-	-
+++ (n)	-	-	-	-	-	-	-

n = Anzahl der Lungengewebssproben; N = Anzahl der negativen Fälle; P = Anzahl der positiven Fälle, (+) = geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp.; + = geringgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp.; ++ = mittelgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp.; +++ = hochgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp.)

Bei fünf Lungengewebssproben sowie den jeweils mitgeführten Positivkontrollen konnten mittels ISH *Pneumocystis* spp. in Form eines ausgeprägten, violett bis braun-schwarzen Signals in den Alveolen nachgewiesen werden.

Nur in einem Fall konnte eine geringgradige (+) Besiedelung des Lungengewebes mit *Pneumocystis* spp. identifiziert werden. Im Gewebeschnitt waren fokale Signale entlang der Alveolarwände, sogenanntes „Alveolar lining“ sowie diffus verteilte Einzelsignale an den Alveolarwänden zu erkennen. Diese Probe bestand aus insgesamt drei Lungenstücken, wobei alle Signale in einem Lungenstück zu finden waren.

In den vier weiteren positiven Proben konnte ein geringstgradiger ((+)) Befall mit *Pneumocystis* spp. mit jeweils ein bis vier Signalen im gesamten Schnittpräparat festgestellt werden. Es handelte sich hierbei in erster Linie um Einzellokalisationen, die vor allem an den Alveolarwänden sichtbar waren. In einem dieser Gewebeschnitte waren die Signale im Gegensatz zu den anderen Präparaten nicht nur an der Alveolarwand, sondern auch im Alveolarlumen, im entzündlichen Exsudat, zu sehen.

## **5.2. Ergebnisse der H&E-Färbung**

Folgende pathologische Veränderungen des Lungengewebes wurden in der H&E-Färbung beurteilt:

- Interstitielle Pneumonie
- Alveolarhistiozytose
- Granulomatöse Pneumonie
- Purulente Pneumonie
- Gemischtzellige Entzündung
- Nekrotisierende Pneumonie
- Bronchitis
- Bronchus-associated lymphatic tissue (BALT)-Hyperplasie
- Alveoläres Lungenödem
- Emphysem
- Hyperämie
- Fibrin
- Perivaskuläre und peribronchiale Rundzellinfiltration
- Anthrakose

- Blutung

Die am häufigsten vertretene Pneumonieform war die interstitielle Pneumonie. Diese stellte sich durch den Verlust von Typ-I-Pneumozyten bei gleichzeitiger Proliferation der Typ-II-Pneumozyten, Dystelektasen sowie einer bei knapp der Hälfte der untersuchten Gewebeprobe nachgewiesene Einwanderung von Makrophagen in die Alveolen (Alveolarhistiozytose) dar. Zusätzlich kann eine lymphozytäre Infiltration des Lungengewebes auftreten. Weitere Entzündungsformen des Lungengewebes, wie granulomatöse, nekrotisierende, purulente sowie gemischtzellige Entzündungen konnten in moderater Anzahl festgestellt werden. Bei ca. zwei Drittel der untersuchten Präparate konnte eine Bronchitis nachgewiesen werden. Auch das Auftreten von Lungenödemem konnte in ähnlichem Umfang beobachtet werden, trat im Vergleich zu Lungenemphysemen dennoch seltener auf. Besonders häufig zeigte das untersuchte Lungengewebe eine mittelgradige Hyperämie. Bei knapp der Hälfte aller Schnittpräparate wurden zudem perivaskuläre und peribronchiale Rundzellularinfiltrate sowie Fibrin im Gewebe nachgewiesen. Anthrakose, BALT-Hyperplasie und Blutung traten nur vereinzelt auf. Als Nebenbefund konnte bei zwei Tieren ein Lungenabszess und bei sechs Tieren eine Pleuritis festgestellt werden. Etwaige fokale Pleuraläsionen führten weiters bei sechs Tieren zu einem Pneumothorax.

Die detaillierte Auflistung der pathologischen Veränderungen ist in Tab. 3 aufgeführt.

**Tab. 3:** Verteilung der pathohistologischen Veränderungen unter allen Proben

<b>Pathohistologie</b>	<b>Summe (n= 76)</b>		<b>Großkatzen (n = 13)</b>		<b>Kleinkatzen (n = 63)</b>	
	n	%	n	%	n	%
Interstitielle Pneumonie	71	93,4	11	14,4	60	78,9
Alveolar- histiozytose	64	84,2	7	9,2	57	75,0
Granulomatöse Pneumonie	34	44,7	5	6,6	29	38,2
Purulente Pneumonie	11	14,4	1	1,3	10	13,2
Gemischte Entzündung	23	30,3	5	6,6	18	23,7
Nekrotisierende Pneumonie	30	39,5	4	5,3	26	34,2
Bronchitis	49	64,5	5	6,6	44	57,9
BALT Hyperplasie	7	9,2	0	0	7	9,2
Alveoläres Lungenödem	46	60,5	7	9,2	39	51,3
Emphysem	71	93,4	11	14,4	60	78,9
Hyperämie	67	88,2	10	13,2	57	75,0
Fibrin	36	47,4	6	7,9	30	39,5
Perivaskuläre/- bronchiale Rundzellinfiltration	41	53,9	9	11,8	32	42,1
Anthrakose	9	11,8	3	3,9	6	7,9
Blutung	3	3,9	0	0	3	3,9

### 5.3. Vorerkrankungen und Koinfektionen

Da diese Studie retrospektiv durchgeführt wurde, sind die verfügbaren Befunde sehr inhomogen. Die Erfassung der Koinfektionen hat einen besonders hohen Stellenwert, da diese eine Schwächung des Immunsystems und damit eine Proliferation von *Pneumocystis* begünstigen können. Den Großteil der Koinfektionen machten bakterielle Infektionen aus, gefolgt von viralen Erkrankungen. Parasitosen und Mykosen traten in moderater Menge auf. Vereinzelt lagen nicht infektiöse Erkrankungen vor und begünstigten möglicherweise Sekundärinfektionen.

Besonders häufig konnten bakterielle Infektionen, sowohl solitär als auch in Kombination mit viralen, parasitären und mykologischen Befunden, nachgewiesen werden. Zu den am häufigsten detektierten bakteriellen Erregern zählten *E. coli*, Streptokokken, Staphylokokken und Clostridien. Weiters konnten Enterokokken, *Enterobacter agglomerans* und Pseudomonaden identifiziert werden. Die Erreger traten in Form von Abszessen, Bakterienrasen, Kolonien oder auch vereinzelt, neben der Lunge und den Bronchien, in verschiedenen Geweben wie der Trachea, Larynx, Pleura, Ösophagus und Darm sowie in Blutgefäßen auf. Auch Sepsis und Septikämie kamen vor.

Die am häufigsten vorkommende virale Koinfektion stellte die durch das feline Parvovirus verursachte Panleukopenie oder Parvovirusenteritis dar. Diese war größtenteils mit bakteriellen Infektionen sowie vereinzelt mit Mykosen vergesellschaftet. Weiters konnte das feline Leukämievirus in moderater Menge nachgewiesen werden, besonders häufig in Gesellschaft bakterieller Kolonisation und vereinzelt mit Mykosen und Parasitosen. Bei einzelnen Individuen wurde zudem eine infektiöse Peritonitis ausgelöst durch das feline Coronavirus nachgewiesen.

Rein parasitäre Infektionen kamen vereinzelt vor, sowie in Kombination mit bakteriellen, viralen und mykotischen Erregern. Besonders häufig trat Toxoplasmose auf, in gleichen Anteilen als singuläre Infektion oder mit bakterieller Koinfektion. Bei zwei Tieren konnte des Weiteren ein hochgradiger Lungenwurmbefall mit reaktiver Pneumonie nachgewiesen werden. Weiters zählten zu den parasitologischen Befunden Protozoen (*Giardia* spp.,

*Trichomonas* spp.), Spulwurm- (*Toxocara* spp., *T. transfuga*), Haarwurm- (*Capillaria* spp.) sowie Bandwurmbefall (*Taenia taeniaeformis*).

Mykosen kamen außerhalb des Atmungstraktes in sehr geringer Anzahl vor. Leider liegen keine Informationen vor, welche Pilze diese Dermatomykosen verursacht haben. Pilzorganismen traten im Lungen- und Bronchialgewebe überwiegend mit anderen Infektionen, meist bakterieller oder viraler Art, auf. Sofern angegeben, waren drei verschiedene Pilzklassen vertreten: Zygomycota (Jochpilze), Ascomycota (Schlauchpilze, u.a. *Aspergillus* spp.) und Hefen (Sprosspilze).

Auch nicht infektiöse Erkrankungen, welche das Immunsystem beeinträchtigen können, wie Felines Asthma, Feline urinary tract disease (FLUTD) und ein metastasierendes Mammakarzinom wurden diagnostiziert. Diese Erkrankungen waren mit keinen spezifischen Koinfektionen korreliert.

#### **5.4. Zusammenführung der Ergebnisse der ISH und der H&E-Färbung**

Im Folgenden wird genauer auf die in der ISH *Pneumocystis*-positiven Fälle eingegangen:

##### **Fall 1**

Nationale: Europäisch Kurzhaar, männlich, Alter unbekannt, Körpergewicht 3,5 kg, Wien  
Sektionsjahr: 2005

Koinfektionen: Parvovirusenteritis

Pathohistologischer Befund:

In der pathohistologischen Untersuchung fiel eine eitrig Bronchitis auf. Zudem konnten in den H&E-Schnittpräparaten in geringgradigem Ausmaß eine interstitielle Pneumonie, eine Alveolarhistiozytose und ein Lungenödem festgestellt werden. Weiters waren Anzeichen von Gewebsnekrose, Bronchitis und Hyperämie erkennbar. Die prägnantesten Veränderungen stellten ein mittelgradiges Lungenemphysem sowie perivaskuläre und -bronchiale Rundzellinfiltrate dar.

ISH: Geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp. ((+))

In der ISH war ein Einzelsignal an der Alveolarwand erkennbar. Das benachbarte Gewebe zeigte in geringgradigem Ausmaß eine interstitielle Pneumonie, eine Alveolarhistiozytose sowie ein Lungenödem.

### **Fall 2**

Nationale: Europäisch Kurzhaar, weiblich, Alter zwei Monate, Körpergewicht 1,4 kg, Niederösterreich

Sektionsjahr: 2011

Koinfektionen: FeLV-Virämie, *E. coli* +++ und *Clostridium perfringens* +++

Pathohistologischer Befund:

In den oberen und unteren Atemwegen waren histologisch zahlreiche Bakterien und stellenweise Fremdmaterial erkennbar, die Veränderungen der Lunge wurden als mittelgradige fibrinös-eitrige, interstitielle Pneumonie mit begleitenden Blutungen beurteilt. Weiters wurde ein herdförmiges alveolares Lungenemphysem festgestellt. Die Alveolen waren moderat mit Alveolarmakrophagen infiltriert und es lag eine mittelgradige Bronchitis vor. Histologisch waren zudem in geringem Ausmaß ein Lungenödem, Hyperämie und gemischtzellige Entzündungen zu erkennen.

ISH: Geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp. ((+))

Mittels ISH konnten vier Einzellokalisationen detektiert werden. Zwei positive Signale konnten an der Alveolarwand in unmittelbarer Umgebung der interstitiellen entzündlichen Infiltrate lokalisiert werden. Die beiden anderen Signale befanden sich lose im Lumen einer leeren Alveole sowie einem mit Ödemflüssigkeit und Alveolarmakrophagen gefülltem Alveolarlumen.

### **Fall 3**

Nationale: Britisch Kurzhaar, weiblich, 6 Jahre alt, Körpergewicht 4,8 kg, Wien

Sektionsjahr: 2012

Koinfektionen: Systemische Mykose

Pathohistologischer Befund:

Das Lungengewebe zeigte eine hochgradige diffuse desquamativ-interstitielle bis fibrinös-eitrig Pneumonie, eine Hyperplasie der Typ II Pneumozyten und ein mittelgradiges interstitielles Ödem. Neben den bereits genannten Befunden konnte eine moderate Bronchitis mit peribronchialen sowie perivaskulären Infiltrationen sowie hochgradige Gewebsnekrosen festgestellt werden. In den Lungenbläschen und Alveolarmakrophagen waren zahlreiche Pilzorganismen darstellbar.

ISH: Geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp. ((+))

An der Alveolarwand waren drei positive Einzelsignale sichtbar. Neben einer hochgradigen Nekrose waren im umgebenden Gewebe vermehrt Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten vorhanden.

#### **Fall 4**

Nationale: Europäisch Kurzhaar, weiblich, 7 Monate alt, Körpergewicht 1,4 kg, Niederösterreich

Sektionsjahr: 2012

Koinfektionen: keine Koinfektionen

Pathohistologischer Befund:

Pathohistologisch fiel eine hochgradige diphteroid-nekrotisierende Laryngitis mit massenhaft Bakterien sowie eine hochgradige hämorrhagische Pneumonie mit Bakterienbeteiligung auf. Das Lungengewebe zeigte in geringem Ausmaß neben ödematösen und emphysematösen Arealen granulomatös entzündetes Gewebe sowie perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate und nekrotisierendes Gewebe. Weiters waren interstitielle Pneumonie, Alveolarhistiozytose und Bronchitis in einem moderaten Umfang erkennbar.

ISH: Geringstgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp. ((+))

In dem ISH-Schnittpräparat wurde ein positives Signal an der Alveolarwand gefunden.

Das umgebende Gewebe stellte sich hochgradig interstitiell entzündet dar, allerdings waren keine Alveolarmakrophagen sichtbar.

**Fall 5**

Nationale: Europäisch Kurzhaar, weiblich, 8 Monate alt, Körpergewicht 0,628 kg, Steiermark  
Sektionsjahr: 2012

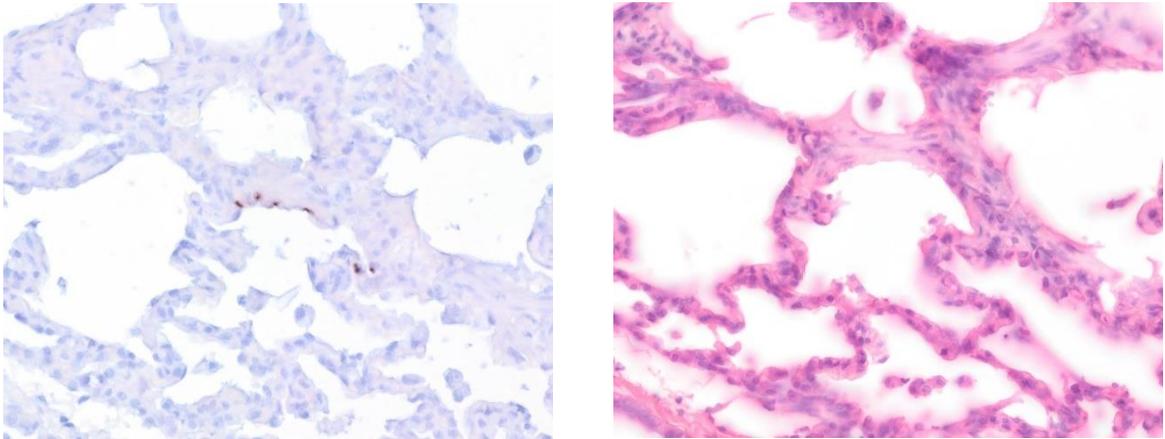
Koinfektionen: Toxoplasmen-Enzephalitis

Pathohistologischer Befund:

Das Lungengewebe zeigte eine hochgradige, nahezu generalisierte fibrinös-eitrige bis stellenweise hämorrhagische Pleuro- und Bronchopneumonie sowie nekrotisierende Bronchiolitis unter Beteiligung von Bakterien. Das Interstitium sowie das perivaskuläre und peribronchiale Gewebe wiesen eine Infiltration mit Entzündungszellen auf. Weiters war eine deutliche Hyperplasie von Typ II Pneumozyten erkennbar. Neben den oben genannten Entzündungsformen waren granulomatös und gemischtzellig entzündete sowie emphysematöse, ödematöse und hyperämische Gewebsareale auffällig.

ISH: Geringgradiges Auftreten von *Pneumocystis* spp. (+)

In diesem Fall konnten in einem Lungenstück fokal Signale entlang der Alveolarwand, sogenanntes „Alveolar lining“ festgestellt werden. Weiters konnten diffus verteilte positive Einzelsignale an den Alveolarwänden detektiert werden. Das Gewebe wies eine hochgradige interstitielle Pneumonie sowie eine geringgradige Alveolarhistiozytose auf. Zwei weitere untersuchte Lungenstücke dieses Tieres zeigten zwar ebenfalls eine hochgradige Pneumonie, allerdings lagen keine positiven ISH-Signale vor.



Europäisch Kurzhaar, weiblich, 8 Monate, Steiermark

Koinfektionen: Toxoplasmenencephalitis

**Abb. 1a:** Geringgradiger (+) Befall mit *Pneumocystis* spp. (ISH 20x); **1b:** Das histologische Bild zeigt eine mittel- bis hochgradige interstitielle Pneumonie. Die Alveolen sind zu einem geringen Teil mit Makrophagen (= Alveolarhistiozytose) infiltriert. (H&E 20x)

Die Korrelation der ISH-Ergebnisse mit den histologischen Lungenbefunden zeigte, dass in den *Pneumocystis*-positiven Fällen vorrangig Bronchitis, interstitielle Pneumonie, Lungenemphysem, Hyperämie und perivaskuläre sowie -bronchiale Rundzellinfiltrate auftraten. Die verschiedenen Schweregrade der Veränderungen sind als Übersicht in Tab. 4 dargestellt.

**Tab. 4:** Schweregrad der pathohistologischen Veränderungen in den *Pneumocystis spp.* positiven Fällen

(0 = nicht vorhanden; 1 = geringgradig ausgeprägt; 2 = mittelgradig ausgeprägt; 3 = hochgradig ausgeprägt; Bei Fällen mit mehreren Lungengewebsstücken wurde der Mittelwert errechnet)

	Fall1 (+)	Fall 2 (+)	Fall 3 (+)	Fall 4 (+)	Fall 5 +
Interstitielle Pneumonie	1	2	0	2	2,5
Granulomatöse Pneumonie	0	0	0	0,6	2,5
Purulente Pneumonie	0	1	3	0	0
Gemischtzellige Entzündung	0	1	3	0	1
Nekrotisierende Pneumonie	1	0	3	1	1,5
Bronchitis	1	2	2	2	3
Alveoläres Lungenödem	0	1	0	1	0,5
Emphysem	2	2	0	1,3	1
Hyperämie	1	1	0	1	1
Alveoläre Histiozytose	1	2	0	2	1
Fibrin	0	0	0	0	0,5
Perivaskuläre/-bronchiale Rundzellinfiltration	2	0	2	1,3	0,5
Anthrakose	0	0	0	0	0
BALT – Hyperplasie	0	0	0	0	0
Blutung	0	0	0	0	1

## 6. Diskussion

Die in dieser Studie erhobene Prävalenz von *Pneumocystis* spp. im Lungenparenchym von Felidae mittels *In situ*-Hybridisierung ist mit einem Wert von 6,6 % sehr gering. Vergleichbare Studien wiesen eine relativ inhomogene Prävalenz zwischen 0 % und 100 % auf (Danesi et al. 2019, Hagler et al. 1987, Shiota et al. 1990, Yang et al. 1996). Hierbei ist zu beachten, dass sich die genannten Studien bezüglich Methodik und Probenmaterial erheblich unterschieden. Shiota et al. konnten *Pneumocystis* spp. mit einer Prävalenz von 70,6 % im Lungengewebe als auch in Abklatschpräparaten von Lungen immunsupprimierter Katzen mittels Giemsa-Färbung als auch GMS nachweisen (Shiota et al. 1990). Das Forschungsteam um Yang et al. untersuchte, im Gegensatz zu Shiota, Katzen, die mit aus Mäuse-Lungen gewonnenen *Pneumocystis*-Organismen inokuliert wurden. Die Organismen konnten ebenfalls durch GMS und Giemsa-Färbung in 100 % der untersuchten Lungengewebsproben detektiert werden (Yang et al. 1996). Im Kontrast hierzu stehen die Studienergebnisse von Hagler et al. (1987). Er untersuchte Gewebeproben von an FeLV vorerkrankten Katzen mittels GMS auf das Vorkommen von *Pneumocystis* spp., der Erreger konnte allerdings bei keinem Tier nachgewiesen werden (Hagler et al. 1987). Danesi et al. (2019) nutzte anstelle von lichtmikroskopischen Verfahren den direkten molekularbiologischen Nachweis von Erreger-DNA mittels PCR. Die Untersuchung von Lungengewebe als auch BALF von Katzen auf das Erbgut des Pilzes ergab, dass die aus den unteren Atemwegen gewonnene Flüssigkeit keine *Pneumocystis*-DNA enthielt, die Prävalenz im Lungengewebe allerdings mit 29% relativ hoch war. Von 15 PCR-positiven Lungengewebsproben wurden zusätzlich Gewebeschnitte angefertigt, die mit Spezialfärbungen gefärbt wurden. Keine dieser 15 Proben wies histologische Veränderungen auf, die in Einklang mit einer *Pneumocystis*-Pneumonie stehen. In den mit GMS und TBO gefärbten Präparaten gab es keinen Hinweis auf Zysten oder Trophozoiten (Danesi et al. 2019).

Der mikroskopische Erregernachweis im paraffinfixierten Schnittpräparat nach Applikation von diversen Spezialfärbungen ist ein praktisches diagnostisches Tool, es gilt jedoch Vor- und Nachteile abzuwägen. Die Interpretation dieser Färbungen bedarf viel Erfahrung und birgt einige potentielle Fehlerquellen (Walker et al. 1989). Die gängigen Methoden GMS, Giemsa-Färbung und Toluidinblau O unterscheiden sich neben der Farbgebung besonders in den Strukturen, die sie färben. Der Vorteil der Giemsa-Färbung liegt darin, mit einer einzelnen,

weit verbreiteten Färbung sowohl Trophozoiten als auch Zysten anfärben zu können, allerdings benötigt man für die Auswertung eine hohe Expertise, da die Zellwände der Zysten ungefärbt bleiben (Walker et al. 1989). Für eine Färbung der zystischen Stadien sind daher GMS und TBO besser geeignet (Thomas und Limper 2004). Sowohl bei der Giemsa-Färbung als auch bei TBO kann es jedoch durch die Anfärbung von Hefepilzen zu falsch positiven Resultaten kommen, da die Farbstoffe nicht wie bei der ISH gegen das Erbgut eines bestimmten Erregers, sondern Zellbestandteile gerichtet sind (Walker et al. 1989). Der molekulardiagnostische Nachweis von *Pneumocystis*-DNA weist daher im Vergleich eine höhere Sensitivität auf, wobei die PCR aufgrund der Amplifizierung von Genmaterial und der maschinellen Untersuchung und Auswertung nochmals sensitiver ist als die ISH.

Die rein morphologische Lokalisation und Anordnung von *Pneumocystis* spp.-Organismen spielt bei der Auswertung der ISH eine wichtige Rolle. Binanti et al. beschrieben 2013 die Verteilung der positiven Signale in Schweinelungen. Multiple Organismen verursachten hier über größere Areale hinweg eine fast kontinuierliche Auskleidung der Alveolarwände („Alveolar lining“). Bei Proben mit einer geringgradigen Konzentration von *Pneumocystis* spp. stellten sich die Signale vereinzelt oder in Gruppen an der Oberfläche der Alveolen dar (Binanti et al. 2014). Ein ähnliches Bild zeigte der in dieser Studie detektierte, geringgradig positive Fall in der ISH, weshalb dieser rein morphologisch als glaubwürdig einzustufen ist. Die vier verbleibenden Gewebeproben mit geringstgradiger *Pneumocystis*-Konzentration müssten mit anderen molekulardiagnostischen Verfahren bestätigt werden. Neben einer PCR wäre eine anschließende Sequenzierung der detektierten DNA empfehlenswert. Da bisher nur drei *Pneumocystis* sp. felis-Sequenzen des mtLSU rRNA-Gens publiziert wurden (Nukleotiddatenbank des National Center for Biotechnology Information, Accession numbers MH818398-MH818400), wäre eine Sequenzierung von höchstem wissenschaftlichem Interesse. Auch die in dieser Studie als positiv befundenen Proben wurden im Anschluss am Institut für Pathologie mittels PCR und Sequenzierung untersucht, jedoch ohne Erfolg. Dies könnte möglicherweise an einer zu niedrigen Erreger-DNA-Menge in den Gewebeschnitten liegen. Routinemäßig durchgeführte Untersuchungen mittels PCR und Sequenzierung setzen voraus, dass das Genom des Erregers bereits bekannt ist. Die *de novo*-Sequenzierung von noch unbekanntem Pathogenen bleibt Forschungseinrichtungen vorbehalten. Auch für *Pneumocystis* spp. gibt es bislang nur wenige publizierte Sequenzen bzw. vollständig

sequenzierte Genome und weitere Untersuchungen sind daher mit viel Aufwand verbunden. Das Whole Genome Sequencing von unbekanntem Genomen setzt zudem eine große fachliche Expertise voraus, die Daten in weiterer Folge durch eine:n Bioinformatiker:in mit Erfahrung für diesen speziellen Erreger bearbeitet werden müssen.

Das alleinige Vorhandensein von *Pneumocystis*-Organismen führt nicht zwingend zu einer klinischen Erkrankung (Settnes und Hasselager 1984). Es zeigen sich erhebliche Unterschiede in der Prävalenz spontaner klinischer Erkrankungen zwischen verschiedenen Tierarten. So konnte in einer Studie bei 51 % von an Pneumonie erkrankten Schweinen das Auftreten von *Pneumocystis* nachgewiesen werden (Kureljušić et al. 2016). Die bei Hunden vorkommende, meist drastisch verlaufende Pneumozystose tritt nur sporadisch auf (Weissenbacher-Lang 2019). Bei Katzen wurde bisher keine spontane Erkrankung beschrieben, ein klinisches Bild konnte nur experimentell durch eine exogene Immunsuppression ausgelöst werden (Shiota et al. 1990, Yang et al. 1996). Ein geschwächtes Immunsystem scheint die Grundvoraussetzung für die Proliferation des Pilzes und die Entstehung einer klinischen Pneumozystose zu sein. Es ist jedoch noch unklar, ob zum Beispiel das Vorliegen von Koinfektionen bereits ausreicht, um ein Pilzwachstum zu ermöglichen oder ob die Immunmodulation in jedem Fall entscheidend ist.

Dem Zusammenhang zwischen einer *Pneumocystis*-Infektion und anderen respiratorischen Pathogenen bei Schweinen gingen Weissenbacher et al. (2017) mittels vergleichender Untersuchungen verschiedener Altersgruppen von Schweinen nach. Bereits in der ersten Lebenswoche konnte bei Ferkeln, welche bereits mit anderen respiratorischen Erregern belastet waren, *Pneumocystis*-DNA nachgewiesen werden. Aufgrund ihres unreifen Immunsystems sind Saugferkel trotz maternaler Antikörper für schwere Infektionen und eine Proliferation des Pilzes empfänglicher als andere Altersgruppen (Weissenbacher-Lang et al. 2017b). Trotz einer besonders hohen Prävalenz bei Saugferkeln scheint eine Erkrankung nicht altersabhängig zu sein und ein gemeinsames Auftreten des Erregers mit anderen Lungenpathogenen stellt keinen Beweis für seinen Einfluss auf multifaktoriell bedingte respiratorische Erkrankungen dar (Kureljušić et al. 2016, Weissenbacher-Lang et al. 2017b). So stieg der Anteil serologisch positiver Tiere mit dem Alter von 16% in der ersten Lebenswoche auf bis zu 87% im dritten Lebensmonat und nahm ab dem vierten Lebensmonat

ab (Blasi et al. 2021, Weissenbacher-Lang et al. 2017b). Dies könnte zum einen durch die Reifung des Immunsystems und dadurch effizientere Bekämpfung von *Pneumocystis* sowie die geringe Durchsetzungsfähigkeit des Pilzes gegenüber anderen Lungenpathogenen in der Konkurrenz um Nährstoffe und Platz bedingt sein. Das von verschiedenen Pneumonien betroffene Lungengewebe zeigt auch in der ISH nur wenige Signale und Läsionen, was die Vermutung nahelegt, dass es aufgrund von suboptimalen Konditionen wie Hypoxie oder mangelhafter Nährstoffversorgung durch Gewebeschädigung zu schlechtem Wachstum und Proliferation im Lungengewebe kommt (Blasi et al. 2021).

Ob und welche Art einer Immunsuppression der caninen Pneumozystose bei Cavalier King Charles Spaniel zugrunde liegt, erforschten im Jahr 2000 Watson et al. Sie untersuchten die Leukozyten-Anzahl im peripheren Blut, sowie die Serumkonzentration von IgG und IgM bei erkrankten und nicht erkrankten Hunden. Erkrankte Hunde wiesen eine signifikant niedrigere IgG- und eine höhere IgM-Konzentration auf als die Kontrollgruppe. Die Lymphozytenzahlen waren im Referenzbereich oder erhöht (Watson et al. 2006, Weissenbacher-Lang et al. 2018). Da das Durchschnittsalter der Tiere bei 3,5 Jahren lag und es keine signifikanten Altersunterschiede zwischen den beiden Gruppen gab, konnten die Veränderungen weder auf das Alter der Tiere oder noch eine Einschränkung der zellulären Immunität zurückgeführt werden. Die Studie kam zu dem Ergebnis, dass ein selektiver Defekt der IgG-Produktion mit niedrigen Serum-Konzentrationen bei an Pneumozystose erkrankten Hunden und unterdurchschnittlichen Konzentrationen bei klinisch gesunden Tieren vorliegen muss. Die erhöhten IgM-Konzentrationen sowie die auch nach Impfung und Therapie niedrig bleibenden IgG-Konzentrationen führten zu dem Schluss, dass es sich um einen Defekt der Antigen-aktivierten B-Lymphozyten mit resultierender Unfähigkeit zur effektiven IgG-Produktion handeln muss. Infolgedessen werden ersatzweise IgM produziert (Watson et al. 2006).

Um festzustellen, ob allen klinischen Pneumozystosen eine Immunsuppression zugrunde liegt, um welche Art der Suppression es sich dabei handelt und ob dies für die Erkrankung bei Katzen eine Rolle spielt, müssten Lymphozyten sowie Immunglobuline M und G sowohl bei erkrankten als auch gesunden Individuen bestimmt und charakterisiert werden. Da in HIV-Infizierten und in murinen Modellen CD4<sup>+</sup> Zellzahlen unter 200 Zellen/ $\mu$ l mit der Entwicklung einer *Pneumocystis*-Pneumonie assoziiert sind, sollten auch diese in Untersuchungen mit einbezogen werden (Phair et al. 1990).

Vier aus fünf ISH-positiven Katzen wiesen Vorerkrankungen auf, zeigten allerdings keine klinischen Symptome einer spontanen Pneumozystose. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützen die These, dass Katzen asymptomatisch mit *Pneumocystis* spp. kolonisiert sein können (Casadevall und Pirofski 2000). Eine Kolonisierung verläuft, im Gegensatz zu einer *Pneumocystis*-Infektion, ohne die Entstehung von Symptomen einer akuten Pneumonie (Morris et al. 2008). Die Besiedelung konnte bisher bei Tieren wie beispielsweise Kleinsäugetern und Affen (Kling et al. 2009, Laakkonen et al. 2001) als auch bei gesunden Kindern (Vargas et al. 2001), immunkompetenten Erwachsenen (Medrano et al. 2005), Schwangeren (Vargas et al. 2003) und immunsupprimierten Populationen sowie an Lungenerkrankungen wie COPD und zystischer Fibrose vorerkrankten Personen beschrieben werden (Mekinian et al. 2011, Nevez et al. 1999, Sing et al. 2001). Ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung zwischen infizierten und kolonisierten Individuen stellt die Ermittlung des so genannten Cycle Threshold ( $C_T$ ) in der quantitativen PCR dar. Dieser ist definiert als der PCR-Zyklus, bei dem die durch die Spaltung der Sonde erzeugte Reporterfluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert über der Basislinie überschreitet und die Reaktion in die exponentielle Phase eintritt (Fujimaki et al. 2000). Der  $C_T$ -Wert ist daher von der in der Probe enthaltenen *Pneumocystis*-DNA-Menge abhängig. Die Anzahl an Zyklen, die benötigt werden, um den festgelegten Schwellenwert zu überschreiten liegt bei infizierten Hunden bei  $\leq 26$ , eine  $C_T$ -Spanne von  $> 26$  bis  $< 35$  spricht für eine Kolonisierung. Werte  $\geq 35$  werden als negativ interpretiert (Danesi et al. 2017). Dieser Cut-off-Wert könnte auch für Katzen angewandt werden, was auch eine Erklärung dafür wäre, warum in den in dieser Studie vorliegenden ISH-positiven Fällen keine klinischen Symptome auftraten und die PCR ergebnislos war. Möglicherweise lag hier eine beginnende Kolonisierung und infolgedessen zu wenig *Pneumocystis*-DNA vor, da eine Immunsuppression aufgrund von kurzer Infektionsdauer noch nicht weit genug fortgeschritten und somit die Bedingungen für eine Proliferation des Pilzes suboptimal waren. Aufgrund des retrospektiven Charakters dieser Studie und der heterogenen, wenigen Vorinformationen zu den Tieren, sowie der geringen Anzahl an vergleichbaren Studien bei Katzen kann demnach keine eindeutige Aussage getroffen werden.

## 7. Zusammenfassung

Der Genus *Pneumocystis* spp. umfasst einzellige, an zahlreiche Säugerlungen angepasste Pilze, welche besonders im Zusammenhang mit Immunsuppression zu schwerwiegenden klinischen Erkrankungen führen können. Da bisher wenige Studien zum Vorkommen des Erregers bei Katzen vorliegen, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Prävalenz von *Pneumocystis* spp. im Lungenparenchym von Felidae mittels *In situ*-Hybridisierung ermittelt, sowie eine Zusammenführung der erzielten Ergebnisse mit den in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch festgestellten Lungenläsionen und der Krankengeschichte der Tiere durchgeführt.

Auswertungen der retrospektiv untersuchten 76 in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Lungengewebsproben ergaben 6,6% *Pneumocystis* spp.-positive Tiere, wovon 100% zur Art der Hauskatzen zählen. Bei einer der insgesamt fünf positiven Katzen konnte eine geringgradige, bei den restlichen vier Tieren nur eine geringstgradige *Pneumocystis* spp.-Konzentration festgestellt werden. Das histologische Bild war vorrangig von interstitieller Pneumonie, Bronchitis, Lungenemphysem, Hyperämie, Gewebnekrosen und perivaskulären sowie -bronchialen Rundzellularinfiltraten geprägt. Weiters waren vier von fünf Tieren nachweislich vorerkrankt. So wurden Koinfektionen mit dem feline Parvovirus, dem feline Leukämievirus, *E. coli* und *Clostridium perfringens*, anderen Pilzen und Toxoplasmen festgestellt.

Eine durch *Pneumocystis* spp. ausgelöste klinische Erkrankung konnte bei Katzen bisher nur experimentell nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Studie belegen die Hypothese, dass spontane klinische Erkrankungen bei infizierten Katzen selten bis gar nicht vorkommen. Allerdings ist dieser Pilz besonders bei Katzen noch wenig erforscht, weshalb weitere Untersuchungen erforderlich sind, um *Pneumocystis* spp. bei Katzen zu beschreiben.

## Summary

### **TITLE Analysis of lung tissue samples of Felidae for the presence of *Pneumocystis* spp. by *in situ* hybridization**

The genus *Pneumocystis* spp. comprises unicellular fungi adapted to numerous mammalian lungs, which can lead to serious clinical diseases, especially in the context of immunosuppression. Since few studies on the occurrence of the pathogen in cats are available so far, the present study determined the prevalence of *Pneumocystis* spp. in the lung parenchyma of Felidae by *in situ*-hybridization and merged the obtained results with the lung lesions histologically detected in hematoxylin-eosin staining and the medical history of the animals.

Evaluation of the 76 formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue samples retrospectively examined revealed 6.6% *Pneumocystis* spp. positive animals, 100% of which were of the domestic cat species. One of the total five positive cats showed a mild *Pneumocystis* spp. concentration, and the remaining four animals were only suspicious for *Pneumocystis* spp. The histopathological examination revealed mainly interstitial pneumonia, bronchitis, emphysema, hyperemia, tissue necrosis and perivascular and bronchial round cell infiltrates. Furthermore, four out of five animals had a history of pre-existing diseases. Thus, co-infections with feline parvovirus, feline leukemia virus, *E. coli* and *Clostridium perfringens*, other fungi, and *Toxoplasma* spp. were detected.

Clinical disease caused by *Pneumocystis* spp. has only been demonstrated experimentally in cats. The results of this study support the hypothesis that spontaneous clinical disease is rare to absent in infected cats. However, little research has been conducted on this fungus, especially in cats, and further studies are needed to describe *Pneumocystis* spp. in cats.

### Abkürzungsverzeichnis

<i>In situ</i> -Hybridisierung	ISH	European AIDS Clinical Society	EACS
Hämatoxylin-Eosin-Färbung	(H&E)-Färbung	Zweimal/Dreimal/Viermal täglich	BID/ TID/ QID
Humanes Immundefizienz-Virus	HIV	Fluoreszenz-ISH	FISH
International Code of Botanical Nomenclature	ICBN	Immunhistochemie	IHC
16S Ribosomale RNA	16S rRNA	Brochoalveolarlavage-Flüssigkeit	BALF
Small subunit rRNA	16S-like rRNA	Entmineralisiertes Wasser	WEK-Wasser
Mitochondrial large subunit	mtLSU	Aqua destillata	Aqua dest.
Elongationsfaktor 3	EF-3	Saline Sodium Citrate	SSC
Grocott-Methenamin-Silberfärbung	GMS	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat	BCIP
Transfer RNA	tRNA	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	NBT
Major surface glycoprotein	Msg	Bronchus-associated lymphatic tissue	BALT
Upstream Conserved Sequence	UCS	Feline urinary tract disease	FLUTD
Basenpaar	bp	Toluidinblau O	TBO
Felines Leukämievirus	FeLV	Large subunit ribosomal RNA gene	mtLSU rRNA-Gen
CD4-positive T-Zellen/ CD8-positive T-Zellen	CD4+ T-Zellen/ CD8+ T-Zellen	Cycle Threshold	C <sub>T</sub> -Wert

## 8. Anhang

### 8.1 Rezepturen

SSC:

Stock-Lösung 20x: 3 M Natriumchlorid (NaCl; Loba, Fischamend, Österreich) + 0,3 M Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 1000 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser

Herstellung der Gebrauchslösungen (SSC 2x, SSC 1x und SSC 0,1x) durch Verdünnung mit Aqua dest.

Puffer I 1x:

Stocklösung 2x: 200 ml Trizma hydrochloride (TrisHCl) 1M pH 7,5 (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 60 ml NaCl 5M (Loba, Fischamend, Österreich) + 740 ml DEPC-Wasser [1 ml DEPC + 1000 ml Aqua dest.]

Herstellung der Gebrauchslösung durch Verdünnung mit Aqua dest.

Puffer III mit MgCl<sub>2</sub> pH 9,5:

100 mM TrisHCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 100 mM NaCl (Loba, Fischamend, Österreich) + 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma, Wien, Österreich) auf 1000 ml DEPC-Wasser

TE-Puffer 1x pH 8,0:

Stock-Lösung 10x: 100 mM TrisHCl (Merck; Darmstadt, Deutschland) + 10 mMol Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 1000 ml DEPC-Wasser

Herstellung der Gebrauchslösung durch Verdünnung mit Aqua dest.

## 9. Literaturverzeichnis

Aliouat-Denis C-M, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. 2008. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, Genetics and Evolution*, 8 (5): 708–726.

Ammich O. 1938. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 302 (2): 539–554.

Anonymous. 1990. Consensus statement on the use of corticosteroids as adjunctive therapy for *Pneumocystis* pneumonia in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 323 (21): 1500–1504.

Aragao HB. 1913. Nota sobre as Schizogonias e Gametogonias dos Trypanosomos. *Brasil Medico*, 27 (27): 271–272.

Baar HS. 1955. Interstitial plasmacellular pneumonia due to *Pneumocystis carinii*. *Journal of Clinical Pathology*, 8 (1): 19–24.

Bartlett M, Cushion M, Fishman J, Kaneshiro E, Lee C, Leibowitz M. 1994. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. The *Pneumocystis* Workshop. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41 (5): 121–122.

Bartlett MS, Angus WC, Shaw MM, Durant PJ, Lee CH, Pascale JM, Smith JW. 1998. Antibody to *Pneumocystis carinii* protects rats and mice from developing pneumonia. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5 (1): 74–77.

Beck JM, Blackmon MB, Rose CM, Kimzey SL, Preston AM, Green JM. 2003. T cell costimulatory molecule function determines susceptibility to infection with *Pneumocystis carinii* in mice. *Journal of Immunology*, 171 (4): 1969–1977.

Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. 1996. Role of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 128 (5): 477–487.

- Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, Shellito JE. 1991. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 5 (2): 186–197.
- Binanti D, Mostegl MM, Weissenbacher-Lang C, Nedorost N, Weissenböck H. 2014. Detection of *Pneumocystis* infections by in situ hybridization in lung samples of Austrian pigs with interstitial pneumonia. *Medical Mycology*, 52 (2): 196–201.
- Blasi B, Sipos W, Knecht C, Dürlinger S, Ma L, Cissé OH, Nedorost N, Matt J, Weissenböck H, Weissenbacher-Lang C. 2021. *Pneumocystis* spp. in pigs: a longitudinal quantitative study and co-infection assessment in austrian farms. *Journal of Fungi*, 8 (1): 43.
- Cabañes FJ, Roura X, Majó N, Bragulat MR, Domingo M. 2000. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a Yorkshire Terrier dog. *Medical Mycology*, 38 (6): 451–453.
- Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. 1996. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *The Lancet*, 347 (9006): 977.
- Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, González-Becerra C, Respaldiza N, La Horra C de, Montes-Cano MA, Vigil E, González de la Puente, M A, Cuello JA. 2004. Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (7): 673–676.
- Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, La Horra-Padilla C de, Dei-Cas E. 2002. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist*, 153 (3): 303–310.
- Cano S, Capote F, Pereira A, Calderon E, Castillo J. 1993. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without predisposing illnesses. Acute episode and follow-up of five cases. *Chest*, 104 (2): 376–381.
- Cardenal R, Medrano FJ, Varela JM, Ordoñez A, Regordan C, Rincon M, Martinez A, Calderon EJ. 2001. *Pneumocystis carinii* pneumonia in heart transplant recipients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 20 (4): 799–802.

Carini A. 1910. Formas de eschizogonia do Trypanosoma lewisi. Sociedad de Medicina e Cirurgia, (38): 8.

Casadevall A, Pirofski LA. 2000. Host-pathogen interactions: basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. Infection and Immunity, 68 (12): 6511–6518.

Chagas C. 1909. Nova tripanozomiazaea humana. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1: 159–218.

Cheng W-L, Ko W-C, Lee N-Y, Chang C-M, Lee C-C, Li M-C, Li C-W. 2014. Pneumomediastinum in patients with AIDS: a case report and literature review. International Journal of Infectious Diseases, 22: 31–34.

Chow C, Templeton PA, White CS. 1993. Lung cysts associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia: radiographic characteristics, natural history, and complications. American Journal of Roentgenology, 161 (3): 527–531.

Cissé OH, Ma L, Dekker JP, Khil PP, Youn J-H, Brenchley JM, Blair R, Pahar B, Chabé M, Van Rompay, Koen K A, Keesler R, Sukura A, Hirsch V, Kutty G, Liu Y, Peng L, Chen J, Song J, Weissenbacher-Lang C, Xu J, Upham NS, Stajich JE, Cuomo CA, Cushion MT, Kovacs JA. 2021. Genomic insights into the host specific adaptation of the *Pneumocystis* genus. Communications Biology, 4 (1): 305.

Cushion MT, Keely SP, Stringer JR. 2004. Molecular and phenotypic description of *Pneumocystis wakefieldiae* sp. nov., a new species in rats. Mycologia, 96 (3): 429–438.

Cushion MT, Smulian AG. 2006. *Pneumocystis* 2006: summary of the research presented at the ninth International Workshop on Opportunistic Protists. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 53 Suppl 1: 80-4.

Cushion MT, Tisdale-Macioce N, Sayson SG, Porollo A. 2021. The persistent challenge of *Pneumocystis* growth outside the mammalian lung: past and future approaches. Frontiers in Microbiology, 12: 681474.

- Danesi P, Corrò M, Falcaro C, Carminato A, Furlanello T., Cocchi M, Krockenberger MB, Meyer W, Capelli G, Malik R. 2019. Molecular detection of *Pneumocystis* in the lungs of cats. *Medical Mycology*, 57 (7): 813–824.
- Danesi P, Ravagnan S, Johnson LR, Furlanello T., Milani A, Martin P, Boyd S, Best M, Galgut B, Irwin P, Canfield PJ, Krockenberger MB, Halliday C, Meyer W, Malik R. 2017. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in dogs. *Medical Mycology*, 55 (8): 828–842.
- Dei-Cas E. 2000. *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Medical Mycology*, (38): 23–32.
- Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. 1998. Animal models of pneumocystosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 22 (1-2): 163–168.
- Dei-Cas E, Chabé M, Moukhliis R, Durand-Joly I, Aliouat EM, Stringer JR, Cushion M, Noël C, Hoog GS de, Guillot J, Viscogliosi E. 2006. *Pneumocystis oryctolagi* sp. nov., an uncultured fungus causing pneumonia in rabbits at weaning: review of current knowledge, and description of a new taxon on genotypic, phylogenetic and phenotypic bases. *FEMS Microbiology Reviews*, 30 (6): 853–871.
- Delanoë P, Delanoë M. 1912. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. *Comptes Rendus de l'Académie des Science*, (155): 658–660.
- Dubin PJ, Kolls JK. 2008. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological Reviews*, 226: 160–171.
- Edman JC, Hatton TW, Nam M, Turner R, Mei Q, Angus CW, Kovacs JA. 1996. A single expression site with a conserved leader sequence regulates variation of expression of the *Pneumocystis carinii* family of major surface glycoprotein genes. *DNA and Cell Biology*, 15 (11): 989–999.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. 1988. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature*, 334 (6182): 519–522.

Eng RH, Bishburg E, Smith SM. 1987. Evidence for destruction of lung tissues during *Pneumocystis carinii* infection. *Archives of Internal Medicine*, 147 (4): 746–749.

Ergin L. 2018. Untersuchung von Lungengewebsproben von Boviden, Cerviden und Cameliden auf das Vorkommen von *Pneumocystis spp.* mittels In situ-Hybridisierung [Bachelorarbeit]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien.

European AIDS Clinical Society. 2021. <https://eacs.sanfordguide.com/>.

Farrow BR, Watson AD, Hartley WJ, Huxtable CR. 1972. *Pneumocystis* pneumonia in the dog. *Journal of Comparative Pathology*, 82 (4): 447–453.

Fischer JM, Keely SP, Stringer JR. 2006. Evolutionary rate of ribosomal DNA in *Pneumocystis* species is normal despite the extraordinarily low copy-number of rDNA genes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53 Suppl 1: 156-8.

Frenkel JK. 1999. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46 (5): 89-92.

Freudenberg E, Tobler W. 1950. Interstitial pneumonia in premature infants. *Annales Paediatrici*, 175 (1-2): 185–200.

Fujimaki S, Funato T, Fujiwara J, Satoh J, Miura T, Kaku M, Tohmiya Y, Sasaki T. 2000. The construction of a standard RNA synthesized for quantitative RT-PCR system. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 48 (1): 54–59.

Gajdusek DC. 1957. *Pneumocystis carinii*; etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics*, 19 (4 Pt 1): 543–565.

Gigliotti F, Garvy BA, Haidaris CG, Harmsen AG. 1998. Recognition of *Pneumocystis carinii* antigens by local antibody-secreting cells following resolution of *P. carinii* pneumonia in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 178 (1): 235–242.

- Gigliotti F, Haidaris CG, Wright TW, Harmsen AG. 2002. Passive intranasal monoclonal antibody prophylaxis against murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infection and Immunity*, 70 (3): 1069–1074.
- Glatt AE, Chirgwin K. 1990. *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. *Archives of Internal Medicine*, 150 (2): 271–279.
- Hagler DN, Kim CK, Walzer PD. 1987. Feline Leukemia Virus and *Pneumocystis carinii* Infection. *The Journal of Parasitology*, 73 (6): 1284–1286.
- Harmsen AG, Chen W, Gigliotti F. 1995. Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. *Infection and Immunity*, 63 (7): 2391–2395.
- Hosoda T, Sakamoto M. 2019. Pneumomediastinum Associated with HIV-positive *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Internal Medicine*, 58 (24): 3607–3608.
- Hughes WT. 1989. *Pneumocystis carinii*: taxing taxonomy. *European Journal of Epidemiology*, 5 (3): 265–269.
- Itatani CA. 1994. Ultrastructural demonstration of a pore in the cyst wall of *Pneumocystis carinii*. *The Journal of Parasitology*, 80 (4): 644–648.
- Ito M, Nozu R, Kuramochi T, Eguchi N, Suzuki S, Hioki K, Itoh T, Ikeda F. 2000. Prophylactic effect of FK463, a novel antifungal lipopeptide, against *Pneumocystis carinii* infection in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (9): 2259–2262.
- Jacobs JL, Libby DM, Winters RA, Gelmont DM, Fried ED, Hartman BJ, Laurence J. 1991. A cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults without predisposing illnesses. *The New England Journal of Medicine*, 324 (4): 246–250.
- Jensen TK, Boye M, Bille-Hansen V. 2001. Application of fluorescent in situ hybridization for specific diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in foals and pigs. *Veterinary Pathology*, 38 (3): 269–274.

Keely SP, Fischer JM, Cushion MT, Stringer JR. 2004. Phylogenetic identification of *Pneumocystis murina* sp. nov., a new species in laboratory mice. *Microbiology*, 150 (Pt 5): 1153–1165.

Kirberger RM, Lobetti RG. 1998. Radiographic aspects of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the miniature Dachshund. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 39 (4): 313–317.

Kling HM, Shipley TW, Patil S, Morris A, Norris KA. 2009. *Pneumocystis* colonization in immunocompetent and simian immunodeficiency virus-infected cynomolgus macaques. *The Journal of Infectious Diseases*, 199 (1): 89–96.

Kling HM, Shipley TW, Patil SP, Kristoff J, Bryan M, Montelaro RC, Morris A, Norris KA. 2010. Relationship of *Pneumocystis jiroveci* humoral immunity to prevention of colonization and chronic obstructive pulmonary disease in a primate model of HIV infection. *Infection and Immunity*, 78 (10): 4320–4330.

Kureljušić B, Weissenbacher-Lang C, Nedorost N, Stixenberger D, Weissenböck H. 2016. Association between *Pneumocystis* spp. and co-infections with *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* in Austrian pigs with pneumonia. *Veterinary Journal*, 207: 177–179.

Laakkonen J, Fisher RN, Case TJ. 2001. Pneumocystosis in Wild Small Mammals from California. *Journal of Wildlife Diseases*, 37 (2): 408–412.

Lee LH, Gigliotti F, Wright TW, Simpson-Haidaris PJ, Weinberg GA, Haidaris CG. 2000. Molecular characterization of KEX1, a kexin-like protease in mouse *Pneumocystis carinii*. *Gene*, 242 (1-2): 141–150.

Limper AH, Merali S. 2003. Summary of *Pneumocystis* research presented at the 8th International Workshop on Opportunistic Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50: Suppl.: 602–604.

- Lobetti R. 2000. Common variable immunodeficiency in Miniature Dachshunds affected with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12 (1): 39–45.
- Lobetti R. 2006. Pneumocystosis. In: Greene CE, Hrsg. *Infectious diseases of the dog and cat*. Dritte Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier, 689–695.
- Lobetti RG, Leisewitz AL, Spencer JA. 1996. *Pneumocystis carinii* in the Miniature Dachshund: case report and literature review. *The Journal of Small Animal Practice*, 37 (6): 280–285.
- Ma L, Chen Z, Huang DW, Cissé OH, Rothenburger JL, Latinne A, Bishop L, Blair R, Brenchley JM, Chabé M, Deng X, Hirsch V, Keesler R, Kutty G, Liu Y, Margolis D, Morand S, Pahar B, Peng L, van Rompay KKA, Song X, Song J, Sukura A, Thapar S, Wang H, Weissenbacher-Lang C, Xu J, Lee C-H, Jardine C, Lempicki RA, Cushion MT, Cuomo CA, Kovacs JA. 2020. Diversity and Complexity of the Large Surface Protein Family in the Compacted Genomes of Multiple *Pneumocystis* Species. *mBio*, 11 (2): e02878-19.
- Ma L, Chen Z, Huang DW, Kutty G, Ishihara M, Wang H, Abouelleil A, Bishop L, Davey E, Deng R, Deng X, Fan L, Fantoni G, Fitzgerald M, Gogineni E, Goldberg JM, Handley G, Hu X, Huber C, Jiao X, Jones K, Levin JZ, Liu Y, Macdonald P, Melnikov A, Raley C, Sassi M, Sherman BT, Song X, Sykes S, Tran B, Walsh L, Xia Y, Yang J, Young S, Zeng Q, Zheng X, Stephens R, Nusbaum C, Birren BW, Azadi P, Lempicki RA, Cuomo CA, Kovacs JA. 2016. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nature Communications*, 7: 10740.
- Mansharamani NG, Balachandran D, Vernovsky I, Garland R, Koziel H. 2000. Peripheral blood CD4 + T-lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest*, 118 (3): 712–720.
- Matsumoto Y, Yoshida Y. 1984. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *The Journal of Protozoology*, 31 (3): 420–428.

- Mazars E, Guyot K, Durand I, Dei-Cas E, Boucher S, Abderrazak SB, Banuls AL, Tibayrenc M, Camus D. 1997. Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice, and rabbits. *The Journal of Infectious Diseases*, 175 (3): 655–660.
- Mazars E, Guyot K, Fourmaintraux S, Renaud F, Petavy F, Camus D, Dei-Cas E. 1997. Detection of *Pneumocystis* in European wild animals. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44 (6): 39.
- McCully RM, Lloyd J, Kuys D, Schneider DJ. 1979. Canine *Pneumocystis* pneumonia. *Journal of the South African Veterinary Association*, 50 (3): 207–209.
- Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, La Horra C de, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano MJ, Varela JM, Calderon EJ. 2005. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (2): 245–250.
- Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron P-Y, Moranne, O. Denis, G., Dei-Cas E, Morell-Dubois S, Lambert M, Launay D, Delhaes L, Hachulla E, Queyrel V. 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology*, 50 (3): 569–577.
- Moon SM, Kim T, Sung H, Kim M-N, Kim S-H, Choi S-H, Jeong J-Y, Woo JH, Kim YS, Lee S-O. 2011. Outcomes of moderate-to-severe *Pneumocystis* pneumonia treated with adjunctive steroid in non-HIV-infected patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 (10): 4613–4618.
- Morris A, Norris KA. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (2): 297–317.
- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. 2008. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *The Journal of Infectious Diseases*, 197 (1): 10–17.
- Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. 1999. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*, 13 (4): 535–536.

Peterson JC, Cushion MT. 2005. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Current Opinion in Microbiology*, 8 (4): 393–398.

Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. 1990. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 322 (3): 161–165.

Pixley FJ, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Molecular Microbiology*, 5 (6): 1347–1351.

Powles MA, Liberator P, Anderson J, Karkhanis Y, Dropinski JF, Bouffard FA, Balkovec JM, Fujioka H, Aikawa M, McFadden D, Schmatz D. 1998. Efficacy of MK-991 (L-743,872), a semisynthetic pneumocandin, in murine models of *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (8): 1985–1989.

Ramos Vara JA, Lu JJ, da Silva AJ, Montone KT, Pieniazek NJ, Lee CH, Pérez L, Steficek BA, Dunstan RW, Craft D, Watson GL. 1998. Characterization of natural occurring *Pneumocystis carinii* pneumonia in pigs by histopathology, electron microscopy, in situ hybridization and PCR amplification. *Histology and Histopathology*, 13 (1): 129–136.

Ramsey IK, Foster A, McKay J, Herrtage ME. 1997. *Pneumocystis carinii* pneumonia in two Cavalier King Charles spaniels. *The Veterinary Record*, 140 (14): 372–373.

Rapaka RR, Ricks DM, Alcorn JF, Chen K, Khader SA, Zheng M, Plevy S, Bengtén E, Kolls JK. 2010. Conserved natural IgM antibodies mediate innate and adaptive immunity against the opportunistic fungus *Pneumocystis murina*. *The Journal of Experimental Medicine*, 207 (13): 2907–2919.

Rose CM, Kimzey SL, Green JM. 2006. The host response of CD28-deficient mice to *Pneumocystis* infection. *Microbial Pathogenesis*, 40 (1): 23–28.

Roths JB, Sidman CL. 1993. Single and combined humoral and cell-mediated immunotherapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient scid mice. *Infection and Immunity*, 61 (5): 1641–1649.

Ruska E, Knoll M. 1932. Das Elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik*, (79): 318–339.

Saleem N, Parveen S, Odigwe C, Iroegbu N. 2016. Pneumomediastinum, pneumorrhachis, and subcutaneous emphysema in *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in AIDS. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 29 (2): 188–190.

Schmatz DM, Romancheck MA, Pittarelli LA, Schwartz RE, Fromtling RA, Nollstadt KH, Vanmiddlesworth FL, Wilson KE, Turner MJ. 1990. Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (15): 5950–5954.

Sedlmeier H, Dahme E. 1955. *Pneumocystis carinii* infection in dog. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*, 93 (3-5): 150–155.

Selik RM, Haverkos HW, Curran JW. 1984. Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) Trends in the United States, 1978-1982. *The American Journal of Medicine*, 76 (3): 493–500.

Selik RM, Starcher ET, Curran JW. 1987. Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends. *AIDS*, 1 (3): 175–182.

Settnes OP, Hasselager E. 1984. Occurrence of *Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë, 1912 in dogs and cats in Denmark. *Nordisk Veterinaermedicin*, 36 (5-6): 179–181.

Sherman M, Levin D, Breidbart D. 1986. *Pneumocystis carinii* pneumonia with spontaneous pneumothorax. A report of three cases. *Chest*, 90 (4): 609–610.

Shiota T, Shimada Y, Kurimoto H, Oikawa H. 1990. *Pneumocystis carinii* Infection in Corticosteroid-Treated Cats. *The Journal of Parasitology*, 76 (3): 441–445.

- Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. 1991. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45 (1): 183–184.
- Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J. 2001. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (7): 2717–2718.
- Stringer JR, Keely SP. 2001. Genetics of surface antigen expression in *Pneumocystis carinii*. *Infection and Immunity*, 69 (2): 627–639.
- Stringer SL, Hudson K, Blase M, Walzer P, Cushion, M., & Stringer, J. 1989. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *Journal of Protozoology*, 36 (1): 14–16.
- Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. 1989. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Experimental Parasitology*, 68 (4): 450–461.
- Sukura A, Saari S, Järvinen AK, Olsson M, Kärkkäinen M, Ilvesniemi T. 1996. *Pneumocystis carinii* pneumonia in dogs--a diagnostic challenge. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8 (1): 124–130.
- Suwanwongse K, Shabarek N. 2020. Tension pneumothorax following *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Cureus*, 12 (1): e6799.
- Tamburrini E, Mencarini P, Luca A de, Maiuro G, Ventura G, Antinori A, Ammassari A, Visconti E, Ortona L, Siracusano A. 1993. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: specificity and sensitivity of polymerase chain reaction in comparison with immunofluorescence in bronchoalveolar lavage specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 38 (6): 449–453.
- Thomas C, Limper AH. 2004. *Pneumocystis* pneumonia. *The New England Journal of Medicine*, 350 (24): 2487–2498.

- Utili R, Durante-Mangoni E, Basilico C, Mattei A, Ragone E, Grossi P. 2007. Efficacy of caspofungin addition to trimethoprim-sulfamethoxazole treatment for severe *Pneumocystis* pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transplantation*, 84 (6): 685–688.
- Van der Meer G, Brug SL. 1942. Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, (22): 301–307.
- Vanek J, Jirovec O, Lukes J. 1953. Interstitial plasma cell pneumonia in infants. *Annales Paediatrici*, 180 (1): 1–21.
- Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, Cumsille F, Gigliotti F. 2001. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (6): 855–861.
- Vargas SL, Ponce CA, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, López R, Belletti J, Velozo L, Avila R, Palomino MA, Benveniste S, Avendaño LF. 2005. Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *The Journal of Infectious Diseases*, 191 (1): 122–126.
- Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. 2003. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci*. *Emerging Infectious Diseases*, 9 (5): 605–606.
- Wakefield A, Pixley F, Banerji S, Sinclair K, Moxon E, Miller R, Hopkin J. 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *The Lancet*, 336 (8713): 451–453.
- Wakefield AE. 2002. *Pneumocystis carinii*. *British Medical Bulletin*, 61: 175–188.
- Wakefield AE, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. 1993. Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *The Quarterly Journal of Medicine*, 86 (6): 401–406.
- Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hall GS, Hawksworth DL, Guiver LA, Allen AG, Hopkin JM. 1992. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the Ustomycetous red yeast fungi. *Molecular Microbiology*, 6 (14): 1903–1911.

Walker J, Conner G, Ho J, Hunt C, Pickering L. 1989. Giemsa staining for cysts and trophozoites of *Pneumocystis carinii*. *Journal of Clinical Pathology*, 42 (4): 432–434.

Watson PJ, Wotton P, Eastwood J, Swift ST, Jones B, Day MJ. 2006. Immunoglobulin Deficiency in Cavalier King Charles Spaniels with *Pneumocystis Pneumonia*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20 (3): 523–527.

Weissenbacher-Lang C. 2019. Porcine and canine pneumocystosis [Habilitationsschrift]. Wien: Veterinärmedizinische Universität Wien.

Weissenbacher-Lang C, Fuchs-Baumgartinger A, Guija-De-Arespacochaga A, Klang A, Weissenböck H, Künzel F. 2018. Pneumocystosis in dogs: meta-analysis of 43 published cases including clinical signs, diagnostic procedures, and treatment. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30 (1): 26–35.

Weissenbacher-Lang C, Fuchs-Baumgartinger A, Klang A, Kneissl S, Pirker A, Shibly S, Ritgen S von, Weissenböck H, Künzel F. 2017a. *Pneumocystis carinii* infection with severe pneumomediastinum and lymph node involvement in a Whippet mixed-breed dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29 (5): 757–762.

Weissenbacher-Lang C, Kureljušić B, Nedorost N, Matula B, Schießl W, Stixenberger D, Weissenböck H. 2016. Retrospective analysis of bacterial and viral co-infections in *Pneumocystis* spp. positive lung samples of Austrian pigs with pneumonia. *PLOS ONE*, 11 (7): e0158479.

Weissenbacher-Lang C, Nedorost N, Knecht C, Hennig-Pauka I, Huber M, Voglmayr T, Weissenböck H. 2017b. Comparison of *Pneumocystis* nucleic acid and antibody profiles and their associations with other respiratory pathogens in two Austrian pig herds. *PLOS ONE*, 12 (9): e0185387.

Wells J, Haidaris CG, Wright TW, Gigliotti F. 2006. Active immunization against *Pneumocystis carinii* with a recombinant *P. carinii* antigen. *Infection and Immunity*, 74 (4): 2446–2448.

Working Group on PCP Prophylaxis for Children. 1995. 1995 revised guidelines for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for children infected with or perinatally exposed to human immunodeficiency virus. National Pediatric and Family HIV Resource Center and National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report, 44 (RR-4): 1–11.

Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. 1999. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. The Journal of Clinical Investigation, 104 (9): 1307–1317.

Wright TW, Notter RH, Wang Z, Harmsen AG, Gigliotti F. 2001. Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during *Pneumocystis carinii* pneumonia. Infection and Immunity, 69 (2): 758–764.

Yang Y, Li Z, Baoping T. 1996. Pneumonia in cats caused by *Pneumocystis carinii* purified from mouse lungs. Veterinary Parasitology, 61 (1-2): 171–175.

Yee D, Fu D, Hui C, Dharmadhikari N, Carino G. 2020. A Rare Case of 4 Ps: Bilateral Pneumothoraces and Pneumomediastinum in *Pneumocystis* Pneumonia. Rhode Island Medical Journal, 103 (5): 52–54.

Yoshida Y. 1989. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. The Journal of Protozoology, 36 (1): 53–60.

Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. 1992. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. Infection and Immunity, 60 (10): 4140–4145.

Zavala J, Rosado R. 1972. *Pneumocystis carinii* in domestic animals of the city of Mexico, Yucatan. Salud Publica de Mexico, 14 (1): 103–106.

Zheng M, Ramsay AJ, Robichaux MB, Kliment C, Crowe C, Rapaka RR, Steele C, McAllister F, Shellito JE, Marrero L, Schwarzenberger P, Zhong Q, Kolls JK. 2005. CD4+ T

cell-independent DNA vaccination against opportunistic infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 115 (12): 3536–3544.