

Impression Smear of Liver Tissue from a Rabbit

**What Is Your
Diagnosis?**

Raida K. Al-Rukibat, DVM; Armando R. Irizarry, DVM; Janice K. Lacey, DVM; Kevin R. Kazacos, DVM, PhD; Scott T. Storandt, DVM, PhD; Dennis B. DeNicola, DVM, PhD

Lebergewebeprobenabstrich von einem Kaninchen

Übersetzung: Susanne Weegmann

Falldarstellung

Von einem kommerziellen Kaninchen-bauernhof, bei dem in der Vorgeschichte Diarrhöe und plötzlicher Tod auftraten, wurde ein 7–11 Wochen altes weibliches Kaninchen lebend zum Tierkrankheitsdiagnoselabor an der Universität Purdue für Sterbehilfe und Obduktion eingereichte. Bei der Überreichung war das Kaninchen dünn und hatte zurück gegangene Fettspeicher und Muskelschwund. Das Kaninchen wog 1013,4 gr. Der Pelz war struppig und am Afterbereich mit Fäkalien behaftet.

Hauptsächliche grobe krankhafte Veränderungen wurden im Dünndarm und in der Leber beobachtet. Der Dünndarm war gedehnt und mit grau-grüner halbester Nahrung gefüllt. Unverdaute Pellets waren noch im Grimmdarm. Die Leber hatte mehrere im Durchmesser 1–3 mm große, etwas angehobene, von getrennt bis verschmolzene gelb-weiße Knötchen, die über das Zellgewebe zerstreut waren. Viele dieser Knötchen enthielten gelb-weißes käsiges Material. Das übrige Zellgewebe war schwer verstopft und ödematös. Luftgetrocknete Abschabungen und Gewebeprobenabstriche der Knötchen wurden vorbereitet und mit einem automatisierten Wright's-Färber (Hematek, Bayerdiagnose, Elkhart, Ind; Abbildung 1) eingefärbt.

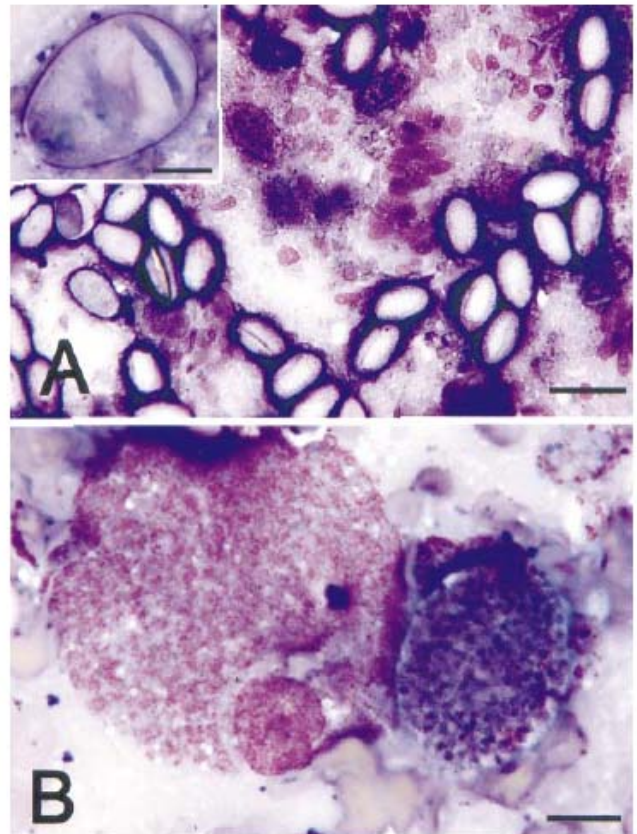


Abbildung 1. Gewebeproben-Abstrich der Leberknötchen von einem Kaninchen. Wright's Färber. (A) Maß = 40 µm; Einfügung: Maß = 10 µm. (B) Maß = 10 µm

From the Department of Veterinary Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Purdue University, West Lafayette, Ind. Dr. Al-Rukibat is now with the Department of Biomedical Sciences and Pathobiology, Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Blacksburg, Va. Corresponding author: Armando Irizarry, DVM, Department of Veterinary Pathobiology, School of Veterinary Medicine, 1243 Veterinary Pathology Building, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-1243 (e-mail: irizarry@vet.purdue.edu).

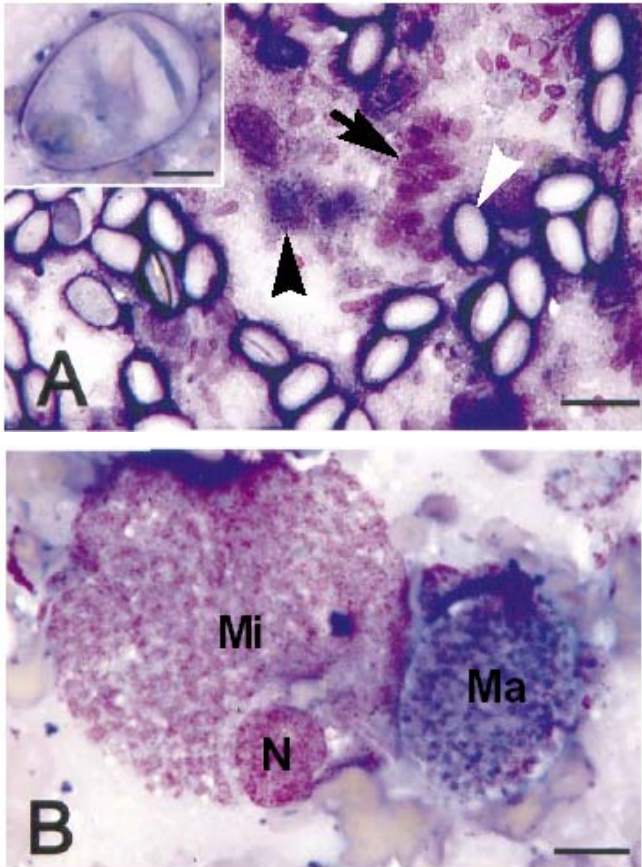


Abbildung 2. Gewebeprobe-Abstrich der Leberknötchen von einem Kaninchen mit Leber-Kokzidiose (die gleichen Bilder wie Abbildung 1). **(A)** Zahlreiche Oozyten (weiße Pfeilspitze) werden mit Leberzellen (schwarze Pfeilspitze) und Gruppen der Gallenwegsepithelialzellen beigemischt (Pfeil). Wright's Färber. Mass=40µm. **Einfügung:** Höhere Vergrößerung einer Oozyten, welche vom Trockner und von der Fixierung geknittert wurde. Mass = 10 µm. **(B)** Eine Microgametozelle (Mi) und Macrogametozelle (Ma). N zeigt den Kern einer Epithelzelle. Wright's Färber. Mass = 10 µm .

Deutung der Zelle

Die Gewebeprobe-Abstriche der Kaninchenleber waren von hoher Zelligkeit und von ausgezeichneten Diagnosequalität. Die Proben umfassten eine hohe Anzahl der Kokzidienorganismen, die mit Lebergrundgewebezellen und einer geringen Anzahl entzündeter Zellen (Abbildung 2A), vermischt waren. Die Kokzidienorganismen waren in den verschiedenen Stadien der Entwicklung, welche die frühen gametösen Stadien, Mikrogametozellen, Makrogametozellen und völlig gebildete Oozyten umfassten.

Oozyten herrschten vor und war eiförmig bis ellipsenförmig und 30-39 zu 18-22 µm groß (Abbildung 2A). Sie wurden durch ein flaches

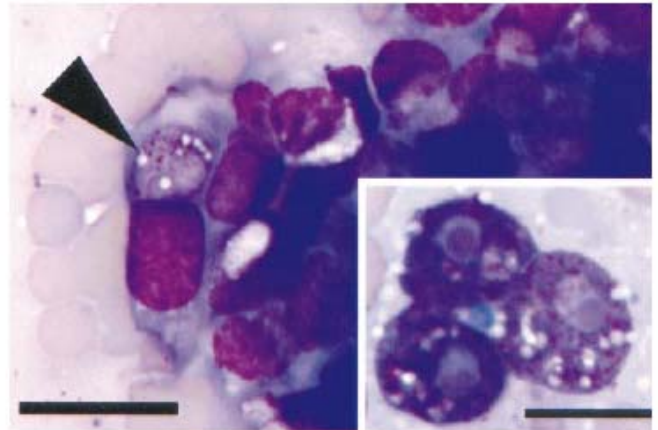


Abbildung 3. Gewebeprobe-Abstrich der Leberknötchen eines Kaninchen mit Leber-Kokzidiose. Intrazelluläre undifferenzierte Stadien von *Eimeria stiedae* sind mit der Übervermehrung von Gallenwegsepithelialzellen (Pfeilspitze) angesiedelt. Maß = 20 µm. **Einfügung:** Höhere lineare Wiedergabe von extrazellulärem undifferenziertem Stadien von *E. stiedae*. Maß = 10 µm.

mikropyles Ende und eine glatte, normalerweise helle rosafarbene Wand, manchmal zerknittert durch Fixierung und Trocknung, gekennzeichnet. Makrogametozellen waren in niedrigerer Anzahl vorhanden. Diese Strukturen waren rund bis oval und 25-34 zu 20 µm groß und gefüllt mit einheitlichen, runden, hellen rosa- oder orangefarbenen bis hin zu bläulichen zytoplasmischen Körnchen (gekennzeichnet als Wand bildende Körper) (Abbildung 2B). Einzelne große, zentral gelegene Kerne wurden vereinzelt gesehen.

Mikrogametozellen waren in sehr geringer Anzahl in den Epithelialzellen (Abbildung 2B) vorhanden. Die Strukturen waren groß, rund und bis zu 50 µm im Durchmesser, und waren in großer Anzahl mit magentaroten bis violetten, runden bis kommaförmigen Mikrogametozellen, jedes in seiner größten Dimension bis zu 5 µm groß, gefüllt. Morphologische undifferenzierte Stadien waren in mäßiger Anzahl vorhanden. Diese Strukturen waren blau, rund, im Durchmesser 8-18 µm groß, mit großem herausragendem ausfallendem Zellkern. Einige dieser Strukturen enthielten feine violette interzelluläre Körnchen und mehrere winzige erkennbare Vakuolen. Diese Stadien waren in den Gallenwegsepithelialzellen vorhanden und außerzellig als Ergebnis von Rissen in den Epithelialzellen (Abbildung 3).

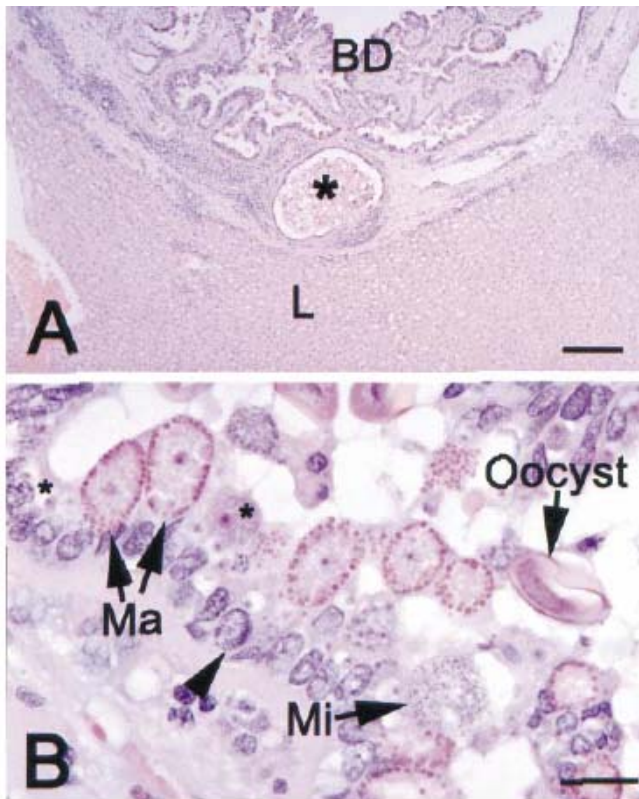


Abbildung 4. Histologischer Abschnitt des Lebergewebes eines Kaninchen mit Leber- Kokzidiose. (A) Das Lebergrundgewebe (L) wird durch einen vergrößerten Gallenweg (BD) zusammengedrückt. Beachten sie die warzenartigen Wedel der Übervermehrung von Gallenwegsepithelzellen und die Ansammlung von außenzelligen Oozyten (*). Hämotoxillin und Eosin. Maß = 200 µm. (B) Höhere Auflösung von Abbildung 4A. Verschieden Entwicklungsstadien des Organismus sind in den Gallenwegszellen (die Pfeilspitze zeigt den Kern einer Epithelzelle) vorhanden, und umfassen Mackogametzellen (Ma), Mikrogametzellen (Mi) und undifferenzierte Stadien (*). Eine Oozyte ist außerzellig vorhanden. Hämotoxillin und Eosin. Maß = 20 µm

In intimer Verbindung mit den Organismen waren zahlreiche dichtzellige, zusammenhaltende Gruppen von mäßigen übervermehrten Gallenwegsepithelialzellen (Abbildung 2A und 3). Diese Zellen waren rund bis würfelförmig bis säulenartig in der Form mit mäßigen Mengen von tiefblauer Zellflüssigkeit. Insgesamt waren Veränderlichkeiten in der Zellengröße, Veränderlichkeiten der Zellkerngröße und die Veränderung des Zellkern: Zellflüssigkeits-Verhältnisses leicht bis mäßig. Wenige

zusammenhaltende Gruppen von Leberzellen wurden gesehen. Einige Leberzellen hatten leichte vakuoläre Veränderungen, stets mit Glykogenansammlungen

und/oder hydropischer Degeneration. Einige Zellen enthielten in der Zellflüssigkeit, stets mit Gallepigmenten, grün-blaue Körnchen (Abbildung 2A).

Eine sehr niedrige Anzahl entzündeter Zellen, bestehend aus kleinen reaktiven Lymphozyten, Plasmazellen und Heterophilen wurden bemerkt. Eine niedrige bis mäßige Anzahl von Erythrozyten wurde auch gesehen. Die zytologischen Entdeckungen waren stets mit einer *Eimeria stiedae* Infektion (Leberkokzidiose) und verbundener Überfortpflanzung von Gallenwegszellen, mit minimaler vakuolärer Leberzellen-Degeneration und intrazellulärer Cholestasis.

Histologische Deutung

Die histopathologischen Entdeckungen in der Leber bestanden hauptsächlich aus umfangreichem Übervermehrungen der Gallenzellen mit zahlreichen Kokzidien in den Rissen. Gallewege wurden deutlich durch die übervermehrten säulenartigen Epithelzellen geweitet und gekennzeichnet, die in mehrfache warzenartige Wedel geworfen wurden (Abbildung 4A). Die zahlreichen einzelligen Stadien, einschließlich undifferenzierte Gamonts, Mikrogametzellen, Makrogametzellen, und sich entwickelnde Oozyten, waren innerhalb der Gallenwegsepithelzellen (Abbildung 4B). Kanalzellräume waren mit zahlreichem dünnwandigem, eiförmigen Oozyten gefüllt. Die übervermehrten Gallenwege wurden von großen Mengen fasrigem Verbindungsgewebe mit leichtem durchsickernden entzündeten Lymphohistozyten umgeben.

Diskussion

Kokzidiose ist hauptsächlich eine Krankheit bei jungen Kaninchen. Angesteckte Erwachsene sind Überträger. Die Krankheit wird häufig, bei züchtenden und aufziehenden Einrichtungen, in denen die Hygiene schlecht ist, gefunden. Ausbrüche der Krankheit sind unter natürlichen Bedingungen üblich. Die wichtigste Sorte der Kaninchenkokzidien ist *E. stiedae*, welche die Gallenwegsepithelzellen befallen. Alle anderen Sorten von Kokzidien werden im Darm gefunden. Von diesen sind vermutlich die wichtigsten Sorten *E. intestinalis*, *E. irresidua* und *E. magna*.

E. stiedae befällt üblicherweise gezähmte Kaninchen in der ganzen Welt. Die Krankheitsausdehnung schwankt abhängig von geographischer Position und Art des Betriebes, wobei

kleinere Bauernhöfe wahrscheinlicher befallen sind. Das Vorkommen bei Laborkaninchen, die von modernen, gut-gehandhabten Züchtungen kommen, ist verringert.

Bei den meisten Infektionen wird geglaubt, dass sie leicht sind, und obgleich leicht Infektionen häufig aus klinischer Sicht nicht erkennbar sind, können schwere Infektionen extrem krankheitserregend sein und zum Tod führen. Junge Kaninchen sind am empfindlichsten; jedoch werden angesteckte Erwachsene Überträger der Krankheit und eine Quelle der Ansteckung. Mengendaten der Krankhaftigkeit und Sterberate sind begrenzt. Die Studien, die in den dreißiger Jahre durchgeführt wurden, deckten auf, dass ungefähr 9% von 2000 untersuchten Kaninchen von Leberkokzidien befallen waren und dass ungefähr 5% von den Todesfällen, der Kokzidiose, besonders durch *E. stiedae*, zuzuschreiben waren. In Frankreich waren 22,5% der toten Schlachtkaninchen mit *E. stiedae* angesteckt. In Brasilien waren 48% der Kaninchen, die in Zuchtfarmen starben, und 64% der Kaninchen, die in den Schlachthäusern getötet wurden mit *E. stiedae* angesteckt. Junge Kaninchen, die experimentell mit 10.000 oder 100.000 Oozyten angesteckt wurden, hatten eine Sterblichkeitsrate von 40% beziehungsweise 80%. Zusätzlich zum dem vorzeitigen Verlust der Kaninchen bei den schweren Fällen, kann *E. stiedae* überlebende Kaninchen für andere Krankheiten anfällig machen und kann eine beträchtliche Abnahme am Gewichtsgewinn, am fettlöslichen Vitaminstoffwechsel, an der Trockensubstanz- und Lipidverdaulichkeit und an der verdaulichen Energie verursachen. Betroffene Lebern sind zum Tode verurteilt. Diese Probleme führen alle zu einem finanziellen Verlust der kommerziellen Züchtereien.

Schwere Infektionen mit *E. stiedae* sind durch Appetitlosigkeit, einen aufgeblähten Bauch und Gewichtsverlust gekennzeichnet. Manchmal treten Durchfall und Gelbsucht auf. Die Leber ist stark vergrößert, die Gallenwege sind geweitet und erscheinen auf der Oberfläche der Leber als weiße, verschieden große Knötchen, die eine cremige Flüssigkeit, voll mit Oozyten enthalten. Die hauptsächlich mikroskopische Organveränderung besteht aus einer Erweiterung und Verdickung der Gallenwege durch die umfangreichen Übervermehrung der Gallenwegsepithelzellen. Entwicklungsformen des Parasiten wurden in den Gallenwegsepithelzellen gesehen, und Oozyten erscheinen in den Zellräumen. Das Lebergrundgewebe wird durch den Druck durch die Erweiterung der

Gallenwege zerstört und wird stufenweise durch faserartiges Bindegewebe ersetzt.

Kaninchen werden durch die Aufnahme der sporenbildenden Oocysts angesteckt. Die Oozyte ist eiförmig bis ellipsenförmig und ungefähr 28-40 zu 16-25 µm groß. Es hat ein flaches mikropyles Ende, eine glatte hell-rosafarbene Wand und ein Mikropyle, aber keine polarisierenden Körnchen oder Rückstände. Die 4 Sporensäcke sind eiförmig, enthalten je 2 Sporozoiten und haben einen Rückstand. Über Sporozoiten dringen durch die Schleimhaut des Dünndarms ein und gehen durch die mesenterischen Lymphknoten und das Leberversorgungssystem in die Leber. In der Leber dringen sie in die Epithelzellen der Gallenwege und gelegentlich in die Grundgewebezellen der Leber ein, in denen sie Trophozoiten und dann Schizont werden. Die Schizont produzieren Merozoiten, aber die Anzahl der vorhergehenden asexuellen Erzeugungen der Gametogamie ist unbekannt. Die Oozyten durchlaufen die Galle und erscheinen 18 Tage nach der Infektion im Kot; Sporenbildung tritt nach 3 Tagen auf.

E. stiedae Infektionen können festgestellt werden, indem man die Oozyten im Kot, aufgrund der Größe, Form und Struktur kennzeichnet. Die Oozyten müssen von denen der Darmkokzidien, die bei Kaninchen auch in großer Anzahl vorhanden sein können, ohne ernste klinische Anzeichen zu verursachen, unterschieden werden. Eine klarere endgültige Diagnose wird durch eine Autopsie der Leber nach dem Tod gestellt.

Kokzidien haben klare Lebenszyklen, und jede Kokzidie ist wirtsspezifisch. Die Funktionseinheit von Kokzidien ist die Zoite (Sporozoite, Merozoite), welche eine frei bewegliche, bananen- oder zigarrenförmige, an einem Ende gerundete und am anderen Ende spitze Zelle ist. Diese frühere Formen wurden nicht in unseren zytologischen Präparaten, vermutlich wegen des späten Stadiums der Infektion bei diesem Kaninchen, gefunden. Die Zoiten wandern innerhalb des Wirtes und dringen in die Zellen ein. Sie stellen die Anfang- und Endpunkte des Kokzidien-Lebenszyklus dar. Wirtsinfektion beginnt mit der Aufnahme der sporenbildenden Oozyten. Bei den *Eimeria*-Sorten enthält jede sporenbildende Oozyte 4 Sporensäcke, von denen jede 2 Sporozoiten enthält. Diese Sporozoiten dringen in die Wirtszellen ein und führen, durch einen internen Spaltungsprozess, Schizogonie genannt zur Entstehung vieler Merozoiten. Die Entwicklung von diesen und von folgenden Stadien tritt innerhalb eines parasitären Vakuums im Zellzytoplasma auf. Die Lebensgeschichte der Kokzidien, wie *Eimeria*, umfasst asexuale

(schizogene) und sexuelle (gametogene) Fortpflanzung.

Während der asexuellen Fortpflanzung (Schizogonie), treten die Sporoziten aus den Oozyten aus und dringen in die Epithelzellen ein. Einmal innerhalb der Epithelzellen, runden sich die Sporoziten ab und formen Trophozoiten, die größer werden und zu Schizonts der ersten Generation werden. Schizonts unterziehen sich einer Kernspaltung, die von einer Zytokinese gefolgt wird und viele Merozoiten bilden. Merozoiten der ersten Generation, die von diesen Schizonts frei gesetzt wurden, dringen in intakte Zellen ein und erzeugen Schizonts der zweiten Generation und so weiter. Die wichtigen Konsequenzen von Schizogonie umfassen, eine exponentiale Zunahme der Anzahl der Parasiten, die aus einem einzelnen Sporoziten entstehen, entsprechender Zerstörung der Wirtszellen und einem automatischen Anhalten des asexuellen Prozesses nach einer festgelegten Anzahl von sich wiederholenden Zyklen.

Während der sexuellen Fortpflanzung (Gametogonie), dringen die Merozoiten, die durch die letzte Schizogonie produziert werden, in intakte Zellen ein und entwickeln sich entweder zu den weiblichen oder männlichen Gamonts. Die Makrogametzellen (weibliche Gamonts) erweitern, sammeln Nährstoffean und verursachen eine Übermäßige Vergrößerung der Wirtszelle. Wenn sie voll entwickelt sind, werden sie Makrogamate genannt und enthalten viele durchsichtige Körnchen (wandbildende Körper) in ihre Peripherie. Die

Mikrogametzellen (männliche Gamonts) unterziehen sich wiederholten Kernteilungen und

die Makrogameten ein. Die Befruchtung löst eine Entstehung einer Zellwand aus, rund um die daraus resultierende Zygote, welche die Oozyte erzeugt, aus. Die nicht sporenbildenden Oozyten werden vom Körper, normalerweise im Kot, freigesetzt. Unter optimalen Bedingungen benötigen die freigesetzten Oozyten einige Tage oder mehr, um in der Umgebung Sporen zu bilden, worauf sie für andere Wirte ansteckend sind.

Acknowledgment

The work of Nancy Martin (Department of Veterinary Pathobiology Histopathology Service) is acknowledged and greatly appreciated.

Key Words: Coccidiosis, cytology, *Eimeria*, liver, rabbit

Citation: Impression smear of liver tissue from a rabbit [coccidiosis]. *Vet Clin Pathol*. 2001;30:57-61.

© American Society for Veterinary Clinical Pathology

References

- Gomez-Bautista M, Rojo-Vazquez FA, Alunda JM. The effect of the host's age on the pathology of *Eimeria stiedae* infection in rabbits. *Vet Parasitol*. 1987;24:47-57.
- Soulsby E. Order: Coccidia Leuckart. In: *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*. 6th ed. Baltimore, Md: Williams and Wilkins; 1968:615-682.
- Gardiner GH, Fayer R, Dubey JP. Apicomplexa. In: *An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues*. 2nd ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1998:20-30.
- Barriga OO. The class Apicomplexa or Sporozoa. In: *Veterinary Parasitology for Practitioners*. 2nd ed. Edina, Minn: Burgess International Group; 1997:26.1-26.4.
- Varga I. Large-scale management systems and parasite populations: coccidia in rabbits. *Vet Parasitol*. 1982;11:69-84.
- Levine ND. Apicomplexa. The Coccidia proper. In: *Veterinary Protozoology*. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1985:130-138, 178, 221-222.
- Barriga OO. *Eimeria stiedae*: weight, oocyst output and hepatic function of rabbits with graded infections. *Exp Parasitol*. 1979;48:407-414.
- Brooks DL. Coccidiosis—life cycle and other rabbit parasites. *Proc Rabbit Health Symp*. 1979;1(1):1-13.
- Meek MW. Coccidiosis in domestic rabbits. In: *Diseases and Parasites of Rabbits and Their Control*. 3rd ed. Montebello, Calif: Reliable Fur Industries; 1943:79-115.
- Percy DH, Barthold SW. Rabbit. In: *Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits*. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1993:179-224.
- Cheeke PR. Nutrition-disease interrelationships. In: *Rabbit Feeding and Nutrition*. Orlando, Fla: Academic Press; 1987:176-200.
- Pakes SP, Gerrity LW. Protozoal diseases. In: Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE, eds. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2nd ed. San Diego, Calif: Academic Press; 1994:205-229.
- Chen CM, Tsai LC, Chung CF, Han SH. Basement membrane in hepatic coccidiosis of the rabbit. *J Comp Pathol*. 1972;82:59-63.
- Schmidt GD. Subkingdom Protozoa. In: *Marvin C. Meyer & O. Wilford Olsen's Essentials of Parasitology*. 4th ed. Dubuque, Iowa: WC Brown; 1988:21-23.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Phylum Protozoa. In: *Veterinary Parasitology*. New York: Churchill Livingstone; 1987:218-220.
- Flynn RJ. Protozoans and neosporans. In: *Parasites of Laboratory Animals*. Ames, Iowa: Iowa State University Press; 1973:54-56.
- Georgi JR, Georgi ME. Protozoans. In: *Parasitology for Veterinarians*. 5th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders; 1990:34-87.
- Hammond DM. Life cycles and development of coccidia. In: Hammond DM, Long PL, eds. *The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and Related Genera*. Baltimore, Md: University Park Press; 1973:45-80.