

# INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *CRYPTOSPORIDIUM BAILEYI* EM AVES DE CORTE: I - ASPECTOS CLÍNICOS, PARASITOLÓGICOS E ZOOTÉCNICOS.

M.V. MEIRELES<sup>1</sup>, A.C. PAULILO<sup>2</sup>, G.S. DA SILVA<sup>3</sup>, A.J. DA COSTA<sup>2</sup>, L.D. JÚNIOR<sup>4</sup> & R.Z. MACHADO<sup>2</sup>.

(1) Depto. de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal-FOA-UNESP, Araçatuba, Caixa Postal 533, CEP 16050-680; (2) Departamento de Patologia Veterinária-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP-Jaboticabal; (3) FCAVJ-UNESP - Bolsista da FAPESP (4) LARA-Campinas .

**SUMÁRIO:** Frangos de corte criados em gaiolas foram inoculados, via oral ou intratraqueal, com diferentes doses de oocistos de *C. baileyi*, para análise de parâmetros clínicos, parasitológicos e zootécnicos. Foram utilizadas 112 aves, distribuídas em sete tratamentos e quatro repetições com quatro aves por parcela. Aos 10 dias de idade procedeu-se a inoculação dos animais, via oral ou intratraqueal, com  $10^3$ ,  $10^5$  e  $10^7$  oocistos. Ao exame clínico observou-se, nos grupos inoculados, via intratraqueal, espirros seguidos de ronqueira, com início três dias após a inoculação (DAI) nas aves inoculadas com  $10^7$  oocistos e 6 DAI nas aves inoculadas com  $10^3$  e  $10^5$  oocistos, com término dos sintomas em todos os grupos aos 23 DAI. Na eliminação de oocistos, observou-se períodos pré-patente de três dias e patente de 18 dias, com pico de eliminação entre 9 e 12 DAI. Foi observada interferência transitória do parasito no ganho de peso das aves, no período entre 10 e 25 dias de idade, sendo mais evidente nos grupos inoculados com a dose mais alta de oocistos.

**PALAVRAS - CHAVE:** *Cryptosporidium baileyi*, frangos de corte, infecção experimental.

## INTRODUÇÃO

O *Cryptosporidium baileyi* é um protozoário que parasita o trato respiratório, a bursa de Fabricius e em menor grau o ceco e o reto de aves domésticas (GOODWIN, 1989).

A infecção respiratória pelo *Cryptosporidium* se caracteriza por doença clínica com aumento de morbidade e mortalidade em frangos de corte (BLAGBURN *et alii*, 1987).

O significado da infecção no intestino e/ou bursa de Fabricius permanece indefinido para a maioria das espécies aviárias, embora o parasitismo intestinal possa provocar doença clínica e aumento da mortalidade em codornas (HOERR *et alii*, 1986) e perus (SLAVIN, 1955).

BLAGBURN *et alii* (1987) observaram interferência do *Cryptosporidium* no ganho de peso de frangos de corte inoculados, via intratraqueal, no período em que as aves apresentavam sinais respiratórios. GUY *et alii* (1988) observaram que a infecção pelo *C. baileyi* associado ao

reovírus resultou em depressão do ganho de peso, durante o período em que a eliminação de oocistos, o desenvolvimento de lesões e o número de parasitos nos tecidos era maior, comparativamente à infecção somente com o *C. baileyi*.

Pintos livres de patógenos específicos, respectivamente, aos quatro e cinco dias de idade, foram inoculados com cepa vacinal da doença de Gumboro e/ou *C. baileyi* (LEVY *et alii*, 1988). Nesse experimento, os autores verificaram uma redução de 6% do peso corporal no grupo inoculado com *C. baileyi*, quando comparado ao grupo controle.

No Brasil, a infecção pelo *C. baileyi* já foi diagnosticada nos Estados de São Paulo por LUVIZOTTO *et alii* (1989) e Rio de Janeiro (MEIRELES & FIGUEIREDO, 1992).

Nesse prisma, realizou-se o presente trabalho que teve como objetivos estudar os aspectos clínicos, parasitológicos e zootécnicos da infecção por uma cepa de *C. baileyi*, isolada no Estado do Rio de Janeiro (MEIRELES & FIGUEIREDO, 1992), via oral e intratraqueal, em frangos de corte criados em gaiola.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Aves experimentais, instalações, manejo e nutrição das aves:

Foram utilizados 112 pintos de corte, machos, da linhagem Hubbard, dispostos em lotes de aves experimentais no 10º dia de vida, precedendo naturalmente à inoculação do *C. baileyi*. Esses pintos foram agrupados com base em peso para formação de parcelas homogêneas e distribuídos, aleatoriamente, em sete tratamentos (grupos) e quatro repetições com quatro aves por parcela.

As aves em sua fase inicial (1-28 dias) foram alojadas em baterias com aquecimento elétrico. O alojamento na fase final (29-42 dias) ocorreu em gaiolas de recria, permanecendo quatro aves por unidade de gaiola.

As aves foram alimentadas com ração comercial (isenta de drogas anticoccidianas) compatível com as diferentes fases do seu ciclo de vida e submetidas às similares condições de manejo usual em avicultura.

Durante o período experimental (10-42 dias de vida das aves), no aviário do departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal - UNESP, os oito grupos de animais foram mantidos isolados o mais distante possível - entre si - para se evitar a influência de um tratamento sobre o outro.

No 10º dia de vida, as aves receberam os inóculos, de acordo com a Tabela 1. Como critério de avaliação do desempenho zootécnico, foram utilizados os resultados de ganho de peso e conversão alimentar.

Tabela 1 - Distribuição das aves nos grupos experimentais.

| Grupo            | Nº de aves <sup>a</sup> | Dose              | Oocistos de <i>C. baileyi</i> |       |
|------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------|-------|
|                  |                         |                   | Inoculação                    |       |
|                  |                         |                   | Via                           | Idade |
| I                | 16                      | 1x10 <sup>3</sup> | intratraqueal                 | 10    |
| II               | 16                      | 1x10 <sup>5</sup> | intratraqueal                 | 10    |
| III              | 16                      | 1x10 <sup>7</sup> | intratraqueal                 | 10    |
| IV               | 16                      | 1x10 <sup>3</sup> | oral                          | 10    |
| V                | 16                      | 1x10 <sup>5</sup> | oral                          | 10    |
| VI               | 16                      | 1x10 <sup>7</sup> | oral                          | 10    |
| VII <sup>b</sup> | 16                      | placebo           | oral                          | 10    |

<sup>a</sup>Coprologicamente negativas para *C. baileyi*.

<sup>b</sup>Grupo testemunha não infectado.

**Obtenção e padronização dos oocistos do *C. baileyi*:** A amostra do *C. baileyi* empregada, isolada no estado do Rio de Janeiro (MEIRELES & FIGUEIREDO, 1992), foi obtida junto ao laboratório de Ornitopatologia do curso de Medicina Veterinária da UNESP - Campus de Araçatuba.

Esses oocistos foram inoculados diretamente no engúvio de pintos de dois dias de idade, para multiplicação do parasito. As fezes dessas aves foram colhidas do 8º ao 13º dia após a inoculação, coadas em peneiras e armazenadas em bicromato de potássio a 2,5% a 4º C.

Posteriormente, os oocistos foram concentrados pelo método de ARROWOOD & STERLING (1987), com algumas modificações, como se segue. Foram utilizadas soluções de açúcar em diferentes concentrações, preparadas a partir de uma solução mãe saturada de açúcar (320 ml de água, 500 g de açúcar e 9 ml de fenol). A partir dessa solução, foi preparada uma solução (A) na diluição de 1:2 e outra solução B na diluição de 1:4. Em um tubo de centrífuga, de capacidade de 100 ml, foram adicionados 30 ml da solução A e sobre a mesma, 30 ml da solução B. Uma alíquota de 15 ml das fezes diluídas em bicromato de potássio foi adicionada sobre a solução B. Os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm por 30 minutos, após o que foi colhida a parte correspondente à solução B, que foi diluída em água com posterior centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos e colheita do sedimento, o qual foi submetido novamente ao mesmo processo de concentração e purificação descrito anteriormente.

Após este processo, os oocistos foram "esterilizados" com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% por 20 minutos (NACIRI *et alii*, 1989), lavados com solução de PBS estéril, para a retirada do excesso de hipoclorito de sódio, com posterior contagem e padronização do inóculo em câmara de Neubauer.

**Índices de produtividade:** Após a distribuição dos pintos em lotes e a partir do início do período experimental (10º dia de vida dos animais), foram efetuados controles de parâmetros zootécnicos, como ganho de peso e conversão alimentar por parcela.

Para tanto, foram realizadas pesagens das rações e das aves aos 10, 25 e 42 dias de idade. A conversão alimentar das aves foi obtida mediante divisão do total de consumo de ração pelo ganho de peso em cada parcela.

**Exames Clínicos:** Todos os grupos foram observados, duas vezes ao dia, durante o período experimental (10-42 dias de vida dos animais). Qualquer manifestação clínica foi devidamente anotada.

### Contagem de oocistos do *C. baileyi* por grama de fezes:

Os oocistogramas foram realizados em amostras de fezes colhidas em bicromato de potássio a cada três dias, em todos os grupos experimentais, com início no 10º dia de idade dos animais e término dois dias após a última detecção de oocistos, conforme metodologia seguida por MEIRELES *et alii* (1995). Essas amostras, correspondentes a 10 g de fezes, foram lavadas por centrifugação com água, para a retirada do bicromato de potássio, diluídas em 90 ml de água e homogeneizadas, sendo a seguir feita a contagem dos oocistos em câmara de Neubauer.

**Delineamento Experimental:** Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e quatro repetições, com quatro aves por parcela. Na verificação dos índices de produtividade nos diferentes lotes de aves experimentais, aplicou-se um modelo de análise de variância descrito por STEEL & TORRIE (1960).

Nos casos em que foram constatadas diferenças significantes, foram executados contrastes, através do método de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Ao exame clínico foram observados sinais clínicos caracterizados inicialmente por espirros e depois por ruídos respiratórios (ronqueira), com início três dias após a infecção (DAI) do *Cryptosporidium* (Grupo III) e seis DAI (Grupos I e II), com término dos sintomas 23 DAI. As aves inoculadas, via oral, não apresentaram sintomatologia clínica.

Os resultados das contagens de oocistos realizadas nas amostras de fezes das aves inoculadas com o *C. baileyi* mostraram período pré-patente de três dias e período patente de até 18 dias. Houve pico de eliminação entre 9 e 12 DAI (Fig.1).

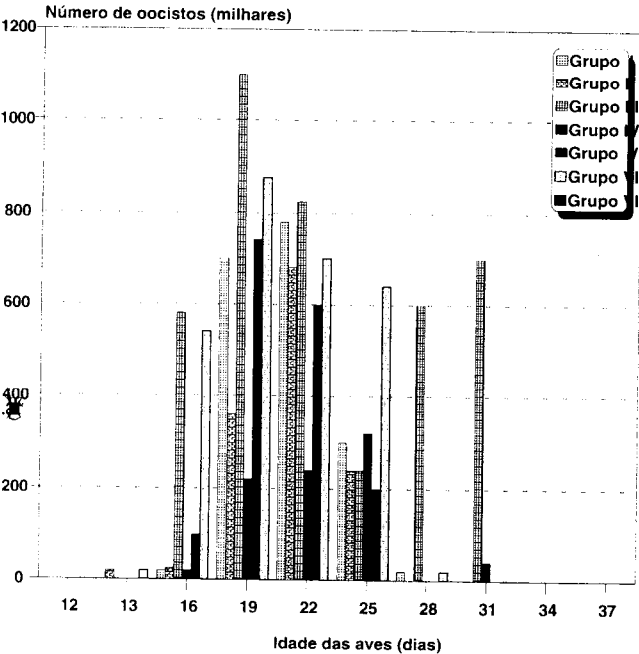


Fig. 1 - Oocistograma de fezes de aves de corte inoculadas com oocistos de *C. baileyi*.

Na análise dos parâmetros zootécnicos observou-se, em linhas gerais, uma tendência de um menor ganho de peso dos animais inoculados com o *C. baileyi* (Grupos I a VI), no período entre 10 e 25 dias de idade, sem alteração da conversão alimentar (Tabela 2).

Tabela 2 - Ganho de peso e conversão alimentar em frangos de corte inoculados com oocistos do *C. baileyi*.

| Grupo | Ganho de Peso (g) |                   | Conversão Alimentar |            |
|-------|-------------------|-------------------|---------------------|------------|
|       | 10-25 dias        | 25-42 dias        | 10-25 dias          | 25-42 dias |
| I     | 710 <sup>ab</sup> | 1034 <sup>a</sup> | 1,87                | 2,10       |
| II    | 671 <sup>ab</sup> | 1081 <sup>a</sup> | 1,82                | 2,02       |
| III   | 650 <sup>ab</sup> | 1081 <sup>a</sup> | 1,82                | 1,94       |
| IV    | 723 <sup>ab</sup> | 1078 <sup>a</sup> | 1,72                | 1,95       |
| V     | 720 <sup>ab</sup> | 1053 <sup>a</sup> | 1,78                | 2,07       |
| VI    | 585 <sup>b</sup>  | 1019 <sup>a</sup> | 2,00                | 2,10       |
| VII   | 762 <sup>a</sup>  | 1031 <sup>a</sup> | 1,81                | 2,12       |
| F     | 3,49*             | 0,53NS            | 2,38NS              | 1,70NS     |

\* Significativo ao nível de 5% de probabilidade. NS = Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.  
Médias seguidas por letras iguais, dentro da mesma coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (p>0,05).

A presença de sinais clínicos, caracterizados por espirros e ronqueira, em aves de corte inoculadas, pela via intratraqueal, mostra que o *C. baileyi*, como sugerido por BLAGBURN *et alii* (1987), pode ser considerado como um dos agentes etiológicos do complexo respiratório das aves.

Os grupos inoculados com a dose mais alta do *Cryptosporidium* (10<sup>7</sup> oocistos) apresentaram uma maior eliminação de oocistos que os demais grupos (Figura 1). Os períodos pré-patente de três dias e patente de 12 a 18 dias são similares aos descritos por CURRENT *et alii* (1986) e BLAGBURN *et alii* (1987).

Após a pesagem das aves e rações aos 10, 25 e 42 dias de idade dos animais, foi observado que houve uma interferência transitória do parasito no ganho de peso das aves, no período entre 10 e 25 dias de idade, sendo mais evidente nos grupos inoculados com a dose mais alta de oocistos (Tabela 2), embora essa interferência seja estatisticamente significativa (p<0,05) somente no grupo VI. Resultados semelhantes foram encontrados em outros experimentos (BLAGBURN *et alii*, 1987; GUY *et alii*, 1988), mas com queda de peso mais acentuada.

Pelos dados apresentados, pode-se inferir que o *C. baileyi* é um parasito capaz de causar doença clínica respiratória em frangos de corte, além de interferir, mesmo que transitoriamente, na performance zootécnica dessas aves. Ficou evidenciado também, neste experimento, que o *C. baileyi* promove infecção clínica auto-limitante no trato respiratório, demonstrando-se assim, que este parasito, na ausência de fatores presentes no complexo respiratório das aves e normalmente encontrados em condições de campo como *E. coli*, fatores ambientais, entre outros, se manifesta como um agente de baixa patogenicidade.

## SUMMARY

Caged broiler chickens were inoculated by the oral or tracheal route with *C. baileyi* oocysts, with variation in infective doses for analysis of clinical signs, effects on growth performance and parasitological parameters. One hundred twelve birds were divided in 7 groups with 4 replicates and 4 birds each replicate. The birds with 10 days old were inoculated with  $10^3$ ,  $10^5$  or  $10^7$  oocysts. The groups receiving oocysts by the tracheal route developed respiratory signs at 3 days after inoculation (DAI) in birds inoculated with  $10^7$  and 6 DAI in birds inoculated with  $10^3$  and  $10^5$  oocysts. At 23 DAI the birds appeared normal, without clinical signs. The oocysts appeared in feces 3 DAI. No oocysts were found in faeces at 18 DAI. *C. baileyi* affected growth performance of inoculated chickens between 10-25 DAI, mainly in groups which received the higher doses of oocysts.

KEY WORDS: *Cryptosporidium baileyi*, broiler chickens, experimental infection.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos de laboratório Antônio José dos Santos e Aparecida Rodrigues Batista pelo auxílio prestado durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ARROWOOD, M.J. & STERLING, C.R. (1987). Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *Journal of Parasitology*, 73, 314-319.
- BLAGBURN, B.L., LINDSAY, D.S. & GIAMBRONE, J.J. (1987). Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 66, 442-449.
- CURRENT, W. L.; UPTON, S. J. & HAYNES, T. B. (1986). The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology*, 33, 289-296.
- GOODWIN, M.A. (1989). Cryptosporidiosis in birds: a review. *Avian Pathology*, 18, 365-384.
- GUY, J.S.; LEVY, M.G. & LEY, D.H. (1988) Interactions of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Diseases*, 32, 381-390.
- HOERR, F.J., CURRENT, W.L. & HAYNES, T.B. (1986). Fatal cryptosporidiosis in a quail. *Avian Diseases*, 30, 421-425.
- LEVY, M.B.; LEY, D.H. & BARNES, H.J. (1988). Experimental cryptosporidiosis and infectious bursal disease virus infections on specific-pathogen-free chickens. *Avian Diseases*, 32, 803-811.
- LUVIZOTTO, M.C.R.; MEIRELES, M.V. & ANDREATTI FILHO, R.L. (1989). Lesões histopatológicas na bursa de Fabricius de frangos de corte determinadas por *Cryptosporidium* spp. In: JORNADA CIENTÍFICA DA ASSOCIAÇÃO DOS DOCENTES DO CAMPUS DE BOTUCATU-UNESP, 1989, Botucatu. Anais. Botucatu: UNESP, 1989, 153p., p. 120.
- MEIRELES, M.V. & FIGUEIREDO, P.C. (1992). Isolamento e identificação do *Cryptosporidium baileyi*, Current *et alii*, (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) em frangos de corte. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 1, 2, 125-130.
- MEIRELES, M.V.; PAULILLO, A.C.; COSTA, A.J., MORAES, F.R.; ÁVILLA, F.A. & SILVA, G.S. (1995). Correlação entre *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium baileyi* em frangos de corte experimentalmente infectados. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 4, 109-116.
- NACIRI, M.; MAZZELLA, O. & COUDERT, F. (1989). Interactions cryptosporidies-virus sauvage ou vaccinal de la maladie de Marek chez le poulet. *Rec. Méd. Vét.*, 4, 383-387.
- SLAVIN, D. (1955). *Cryptosporidium meleagridis* (sp.nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65, 262-266.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. (1960). *Principles and procedures of statistics*. New York: McGraw-Hill Book Company, 481 p.

(Received 22 November 1996, Accepted 16 April 1997)