

## Contaminação por *Cryptosporidium* spp. em esterco utilizado como adubo em hortas urbanas

## Contamination with *Cryptosporidium* spp. in manure used as fertilizer in urban gardens

Adriana J. Almeida<sup>1</sup>, Verônica S. Lima<sup>2</sup>, Ana B.F. Rodrigues<sup>1</sup>, Paula A. Di Filippo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal (LCCA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28013-602.

<sup>2</sup>Bio Bichos Clínica Veterinária, Rua São Paulo, 2253, Itoupava Seca, Blumenau, SC. CEP 8903-000.

**Resumo:** Esta pesquisa teve como objetivo a detecção de *Cryptosporidium* spp., um protozoário entérico, do qual algumas espécies podem apresentar caráter zoonótico, em esterco utilizado como adubo em hortas urbanas localizadas em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, assim como determinar possíveis fatores de risco para a contaminação do esterco. Foram escolhidas 15 hortas urbanas que adicionam compostos orgânicos de origem bovina ao solo após a técnica de compostagem para o plantio. Foram coletados 200 g de esterco em três pontos: ápice, interior e base do montante de esterco. As amostras foram fixadas em solução de formol a 10%, concentradas através da Técnica de Ritchie modificada, e coradas pela Técnica de Ziehl-Neelsen modificada para observação dos oocistos. Os resultados obtidos demonstraram que 53% das hortas estavam contaminadas por *Cryptosporidium* spp., e que diferentes condições de higiene, origem do esterco e do abastecimento hídrico, e o processo de compostagem não foram capazes de eliminar o parasito do adubo.

**Palavras-chave:** Contaminação ambiental, *Cryptosporidium*, hortaliça, diarreia.

**Summary:** This research aimed the detection of *Cryptosporidium* spp., a zoonotic enteric protozoan, in manure used as fertilizer in urban gardens located in Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, and to determine possible risk factors for manure contamination. There were chosen 15 urban gardens that usually add organic compounds to the ground after the composting technique for planting. About 200 g of manure were collected at three points of the manure amount: apex, interior and base. The samples were fixed in formalin 10%, concentrated by modified Ritchie technique, and stained by Ziehl-Neelsen modified technique for oocysts observation. Results obtained showed that 53% of the gardens were positive for *Cryptosporidium* spp., and that different conditions of hygiene, manure source and water supply, and the composting process have not been able to eliminate the parasite from the fertilizer.

**Keywords:** Environmental contamination, *Cryptosporidium*, vegetables, diarrhea.

### Introdução

Protozoários do gênero *Cryptosporidium* são reconhecidos por serem causa de diarreia em pessoas, sendo os casos mais graves detectados em crianças, especialmente em países em desenvolvimento. Os sintomas incluem vômitos, náuseas e dor abdominal e a forma assintomática da doença é relatada com frequência (Chalmers e Davies, 2010).

Acredita-se que a contaminação através da ingestão de água e alimentos contendo oocistos do parasito possa ser a maior fonte de infecção da doença, aumentando a sua importância em saúde pública (Bouzid *et al.*, 2008).

Em indivíduos portadores do vírus HIV, a criptosporidiose manifesta-se de forma intensa, com quadros altamente espoliativos, podendo levar à desidratação e evoluir para a síndrome da má-absorção intestinal e caquexia (Pantenburg *et al.*, 2009). A doença também é capaz de causar diarreia persistente, febre e dor abdominal (Ribeiro *et al.*, 2004).

A presença de oocistos de *C. parvum* em fezes de bovinos implica necessariamente na contaminação ambiental por estes parasitos (Mawdsley *et al.*, 1996), inclusive quando há a utilização de esterco para a adubação de solos a serem usados para o cultivo de hortaliças, técnica utilizada com o objetivo de obtenção de melhorias nas propriedades físicas e químicas do solo (Kuczynska *et al.*, 2005).

A importância da adubação orgânica em hortaliças é amplamente reconhecida, principalmente nas folhosas, visando compensar as perdas de nutrientes ocorridas durante seu cultivo, havendo aumento na produção ao utilizar-se esterco bovino (Kimoto, 1993). Para tal, torna-se conveniente a fermentação e/ou compostagem destes resíduos objetivando a estabilização do material orgânico, redução dos riscos de disseminação de pató-

\*Correspondência: jardim@uenf.br; drijardim@yahoo.com.br  
Tel: (22) 2748-6072, (22) 2748-6056

genos e aumento da disponibilidade de nutrientes para as culturas (Sediyama *et al.*, 2000). Após este processo, o material orgânico é adicionado ao solo, podendo servir como meio de exposição à população humana, inclusive através da consequente contaminação da água, refletindo em grave problema em saúde pública. Já foi demonstrado que oocistos do gênero *Cryptosporidium* são capazes de permanecer em diversos tipos de solos (Mawdsley *et al.*, 1996), resistindo a variações de temperatura e pH (Fayer e Nerad, 1996). Estes parasitos são capazes de continuarem infectantes no ambiente por períodos de até 18 meses, particularmente quando estão associados ao material fecal (Yang *et al.*, 1996).

As fontes de contaminação de águas e alimentos por oocistos de *Cryptosporidium* spp. no Brasil são desconhecidas devido à carência de estudos epidemiológicos no país. Todavia, a rota de transmissão do oocisto do animal para os sistemas de abastecimento hídricos e para o alimento através do ambiente deve ser determinada, para que medidas estratégicas de controle sejam implementadas, visando a prevenção da contaminação destes sistemas.

Este trabalho teve como objetivo a detecção de *Cryptosporidium* spp. em esterco utilizado como adubo em hortas urbanas localizadas em Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, assim como determinar possíveis fatores de risco para a contaminação do esterco.

## Material e métodos

Foi realizado um estudo preliminar para o levantamento das hortas localizadas na área urbana da cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro através de listagem fornecida pela Prefeitura Municipal. Foram escolhidas 15 hortas urbanas que adicionam compostos orgânicos de origem bovina ao solo após a técnica de compostagem para o plantio. Este estudo foi realizado através de saídas para geo-referenciamento dos locais escolhidos.

Foram coletados 200 g de esterco após o processo de compostagem. As coletas foram feitas em três pontos: superfície, meio e base do montante de esterco, sendo coletados 200 g de cada ponto. As amostras foram colocadas em tubos cônicos, identificados e refrigerados. As mesmas foram levadas ao Laboratório de Sanidade Animal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias para a continuidade dos procedimentos.

Os responsáveis pelas propriedades foram entrevistados, com intuito de avaliar o tipo de cultivo, a fonte de água utilizada para irrigação, as condições de higiene e a proveniência do esterco. Para as condições de higiene foram utilizados parâmetros como livre acesso de animais domésticos e/ou seus dejetos às hortas, presença de tocas de roedores e presença de lixo ou entulhos no local.

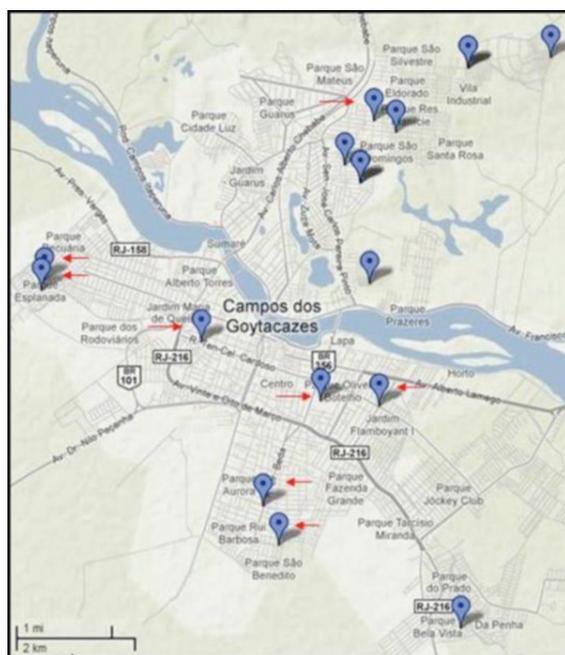
Cerca de 1g de cada amostra foi fixado em solução de formol a 10% em tubos cônicos. As amostras fo-

ram concentradas através da Técnica de Ritchie modificada (Allen e Ridley, 1970), e coradas pela Técnica de Ziehl-Neelsen modificada (Henriksen e Pohlenz, 1981). Após secagem, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico, em objetiva de 100x (imersão).

Os resultados foram analisados estatisticamente através do Teste de Fisher (Fisher Exact Test), com 95% de intervalo de confiança, utilizando-se o programa GraphPad InStat (1996).

## Resultados e discussão

Foram identificados oocistos do gênero *Cryptosporidium* nas amostras de esterco em oito hortas, sendo que, em todos os montantes positivos, tanto o ápice quanto a base e o interior apresentaram oocistos do protozoário. Portanto 24 (53,3%), das 45 amostras foram consideradas positivas. As localizações aproximadas das hortas, bem como as hortas positivas e negativas para o protozoário podem ser visualizadas na Figura 1.



**Figura 1** - Localização aproximada das 15 hortas urbanas em Campos dos Goytacazes - RJ utilizadas para a colheita do esterco e entrevistas. As setas indicam locais onde houve positividade para *Cryptosporidium* spp.

As origens da contaminação de alimentos por protozoários geralmente são as fezes, solo e água contendo materiais fecais e desprovidos de tratamento (Smith, 1998). A contaminação indireta por oocistos de *Cryptosporidium* inclui a utilização de esterco para adubação do solo, e a distribuição do gado, fatos que podem ser agravados por chuvas fortes, levando os parasitos até lençóis de água subterrâneos e demais fontes de água (Carvalho, 2009) e, conseqüentemente, a diversos hospedeiros em diferentes regiões. Surto em humanos

relacionados à água superficial foram descritos, e as origens de contaminação foram atribuídas ao despejo de esgoto e ao escoamento de águas providas de áreas agrícolas, principalmente pastagens ou locais em que o esterco contaminado havia sido aplicado ao solo (Fricker *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que o adubo de origem fecal adicionado ao solo é capaz de fazer com que a área se torne um fator de risco para a criptosporidiose em humanos, e que trabalhadores rurais, possuem maior probabilidade de desenvolver a doença (Lake *et al.*, 2007).

A contaminação do esterco e posteriormente da água ainda possui alguns agravantes: as densidades de contaminação ambiental infectantes são suficientes para poluir o ambiente aquático, e os oocistos são bastante pequenos para atravessarem as barreiras físicas utilizadas no processo de tratamento da água além de serem resistentes aos desinfetantes comumente empregados em seu tratamento (Smith, 1998).

Através das entrevistas realizadas com os responsáveis pelas hortas foi observado que os locais dos cultivos são terrenos cedidos pela prefeitura do município de Campos dos Goytacazes – RJ. O esterco utilizado é obtido tanto através da prefeitura, quanto de particulares, geralmente carroceiros, que coletam o esterco e vendem para os produtores.

Em relação ao cultivo, 100% das hortas plantavam alface, agrião, cebolinha, cheiro-verde, couve chinesa, chicória, salsa e espinafre, e o destino deste plantio era para consumo próprio, comercialização no próprio local e/ou pequenos comércios e uma parte da plantação era enviada para algumas creches da prefeitura.

O abastecimento fluvial em cinco das 15 hortas ocorria através de poços no próprio local da horta, já nas demais hortas, a água era oriunda da companhia de água.

Analisando a Tabela 1, nota-se que não houve diferença significativa entre a positividade para *Cryptosporidium*

*spp.* em adubos utilizados para o cultivo de hortaliças e para o cultivo de leguminosas, havendo portanto, contaminação em ambos os tipos de plantações, sendo  $p = 0,11$ .

Adicionalmente, pode-se observar que não houve diferença significativa para a positividade de *Cryptosporidium spp.* nas hortas as quais utilizavam diferentes fontes de água, já que  $p = 0,11$ , demonstrando que existe a contaminação do esterco independente da fonte de água utilizada. Em pesquisa desenvolvida no Canadá, bezerros cuja principal fonte de água provém de poço estão associados com menores concentrações de oocistos eliminados nas fezes, ao contrário de animais com acesso a fontes de água tratada parada (Heitman *et al.*, 2002).

Oocistos de *Cryptosporidium* podem permanecer viáveis na água por mais de 140 dias. Nos EUA existem relatos de contaminação por oocistos em cerca de 90% das águas superficiais, como rios e lagos (Simmons III *et al.*, 2001), assim como existem diversos relatos de presença de oocistos do gênero *Cryptosporidium* em águas de rio e nascentes no Japão (Tiangtip e Jongwutiwes, 2001), Taiwan (Watanabe *et al.*, 2005), Brasil (Farias *et al.*, 2002), entre outros.

Com relação à origem do esterco utilizado na horta, foi demonstrado que não houve diferença significativa entre o esterco de origem conhecida e desconhecida, sendo  $p=0,31$ . O produto, quando de origem desconhecida, era adquirido através de vendedores ambulantes, que costumam levar o esterco até a horta.

Hoar *et al.* (1999), pesquisaram a prevalência de *Cryptosporidium* no esterco de bovinos confinados e em amostras coletadas no ambiente, e concluíram que 0,17% estavam positivos. Estes resultados são semelhantes ao estudo realizado por Walker *et al.* (2001) em que 0,18% das amostras coletadas possuíam oocistos do protozoário. Quando a pesquisa

**Tabela 1** - Risco relativo da presença de *Cryptosporidium spp.* em amostras de esterco de 15 hortas urbanas em relação às variáveis analisadas

Fonte de água	Resultado	Variável		Total	Valor de $p^1$	
		Poço	Tratada			
Fonte de água	Positivo	1	7	8	0,11	
	Negativo	4	3	7		
Produto cultivado			Hortaliças	Leguminosas	Total	Valor de $p^1$
	Positivo	1	7	8		
	Negativo	1	6	7		
Origem do esterco			Prefeitura/Particular	Desconhecida	Total	Valor de $p^1$
	Positivo	5	3	8		
	Negativo	2	5	7		
Higiene do local			Boa	Ruim	Total	Valor de $p^1$
	Positivo	8	0	8		
	Negativo	5	2	7		

<sup>1</sup>Fisher's Exact Test (CI=95%)

foi feita com fezes frescas, o resultado foi seis vezes maior, sugerindo que o material fecal, após depositado no ambiente, pode sofrer influências ambientais que reduziriam a carga efetiva do parasito no esterco (Walker *et al.*, 2001). Estes dados demonstram que o tempo e as influências ambientais não foram capazes de eliminar os oocistos do material fecal.

A maioria das hortas visitadas possuía condições de higiene consideradas boas (86,7%) e em outras, cujas condições de higiene foram consideradas ruins, havia a presença de animais como cães, roedores, galinhas, gatos, além de ausência na proteção de poços e de locais de armazenamento da água utilizada para irrigação. Observando-se ainda os dados da Tabela 1, pode-se notar que não houve diferença significativa a positividade para *Cryptosporidium* entre hortas com condições de higiene boas e em outras cujas condições de higiene foram consideradas ruins,  $p = 0,20$ .

Almeida *et al.* (2008) não observaram diferenças significativas na positividade para este parasito entre criações de bovinos com condições de higiene consideradas boas (41%) e em outras cujas condições de higiene foram consideradas ruins (20%). Da mesma maneira, Maldonado-Camargo *et al.* (1998), não observaram diferenças significativas entre a eliminação de oocistos e as práticas higiênicas em animais de produção, o que nos leva a sugerir que os protozoários estão presentes nos animais e no ambiente, independentemente das condições de higiene encontradas nas diferentes propriedades rurais e urbanas.

As amostras de esterco foram coletadas de três pontos diferentes do montante de esterco: ápice, interior e base, e foram detectadas 24 amostras positivas e 21 negativas.

Com relação aos pontos de coleta, o gênero *Cryptosporidium* esteve presente em todo o montante de esterco independente de sua altura e armazenamento. Ou seja, mesmo quando o ápice e a base tiveram em maior contato com a luz solar, os oocistos persistiram.

## Conclusão

Observou-se contaminação por *Cryptosporidium* spp. em grande parte das hortas urbanas em Campos dos Goytacazes – RJ. Diferentes condições de higiene, origem do esterco e do abastecimento hídrico, o processo de compostagem e a localização do ponto de coleta no monte de esterco não foram capazes de eliminar o parasito do adubo.

## Bibliografia

- Almeida AJ, Oliveira FCR, Teixeira CS (2008). Risco relativo da infecção por parasitos do Gênero *Cryptosporidium* em bezerras bovinas no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17, 243-248.
- Allen AVH, Ridley DS (1970). Further observations on the formol ether concentration technique parasites. *Journal of Clinical Pathology*, 23, 545-546.
- Bouzid M, Steverding D, Tyler KM (2008). Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Current Opinion Biotechnology*, 19, 302-306.
- Carvalho TTR (2009). Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. *Revista de Patologia Tropical*, 38, 1-16.
- Chalmers RM, Davies AP (2010). Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124, 138-46.
- Farias EWC, Gamba RC, Pellizari VH (2002). Detection of *Cryptosporidium* in raw sewage and creek water in the city of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 41-43.
- Fayer R, Nerad T (1996). Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1431-1433.
- Fricker CR, Medema GD, Smith HV (2002). Protozoan parasites (*Cryptosporidium*, *Giardia*, *Cyclospora*). In: Guidelines for drinking water – addendum microbiological agents in drinking water, 2ª edição. SNPBest-set/Interprint (Geneva, Suíça). WHO, 70-118.
- Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RC, Olson ME (2002). Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 530-541.
- Henriksen SA, Pohlenz JFL (1981). Staining of Cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22, 594-596.
- Hoar BR, Atwill ER, Elmi C, Utterback WW, Edmondson AJ (1999). Comparison of fecal samples collected per rectum and off the ground for estimation of environmental contamination attributable to beef cattle. *Journal Veterinary Research*, 60, 1352-1356.
- Kuczynska E, Shelton DR, Pachepsky Y (2005). Effect of bovine manure on *Cryptosporidium parvum* oocyst Attachment to Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6394-6397.
- Kimoto T (1993). Nutrição e adubação de repolho, couve-flor e brócolis. In: Nutrição e adubação de hortaliças (Jaboticabal), 149-178.
- Lake IR, Harrison FCD, Chalmers RM, Bentham G, Nichols G, Hunter PR, Kovats RS, Grundy C (2007). Case-control study of environmental and social factors influencing cryptosporidiosis. *European Journal of Epidemiology*, 22, 805-811.
- Maldonado-Camargo S, Atwill ER, Saltijeral-Oaxaca JA, Herrera-Alonso LC (1998). Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Friesian dairy calves in central México. *Preventive Veterinary Medicine*, 36, 95-107.
- Mawdsley JL, Brooks AE, Merry RJ (1996). Movement of the protozoan pathogen *Cryptosporidium parvum* through three contrasting soil types. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 30-36.
- Pantenburg B, Cabada MM, White AC Jr (2009). Treatment of cryptosporidiosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7, 385-391.
- Ribeiro PC, Pile E, Queiroz MMC, Norberg NA, Tenório JRO (2004). Cryptosporidiosis occurrence in HIV + patients attended in a hospital, Brazil. *Revista Saúde Pública*, 38, 469-470.

- Sediyama MAN, Garcia NCP, Vidigal SM, Matos AT (2000). Nutrientes em compostos orgânicos de resíduos vegetais e dejetos de suínos. *Scientia Agricola*, 57, 185-189.
- Simmons III OD, Sobsey MD, Heaney CD, Chaefer III FW, Francy DS (2001). Concentration and detection of *Cryptosporidium* oocysts in surface water samples by Method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration. *Applied and Environmental microbiology*, 67, 1123-1127.
- Smith HV (1998). Detection of parasites in the environment. *Parasitology*, 117, 113-141.
- Tiangtip R, Jongwutiwes S (2001). Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from patients in Thailand. *Tropical Medicine & International Health*; 7, 357-364.
- Walker M, Leddy K, Hagar E (2001). Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5526-5529.
- Watanabe Y, Kimura K, Yang CG, Ooi HK (2005). Detection of *Cryptosporidium* sp. oocyst and *Giardia* sp. cyst in faucet water samples from cattle and goat farms in Taiwan. *Parasitology*, 67, 1285-1287.
- Yang S, Healey MC, Du C (1996). Infectivity of preserved *Cryptosporidium parvum* oocysts for immunosuppressed adult mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 13, 141-145.