

Identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) pela técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina

Blood meals identification of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia (Lutzomyia) almerioi* (Galati & Nunes, 1999) by enzyme-linked immunosorbent assay biotin-avidin

Ana Maria Marassá¹, Cleide Aschenbrenner Consales², Eunice Aparecida Bianchi Galati³ e Vânia Lúcia Brandão Nunes⁴

RESUMO

Lutzomyia longipalpis e *Lutzomyia almerioi*, espécies integrantes da fauna flebotomínea da Serra da Bodoquena, no Estado de Mato Grosso do Sul, têm sido objeto de estudo devido às suas elevadas abundâncias no Assentamento Guaicurus, foco de leishmaniose tegumentar humana e visceral canina. Em pesquisas que vem sendo realizadas neste acampamento para a identificação de vetores destas parasitoses, foram capturados no período de 2002 a 2004, com armadilhas automáticas luminosas, instaladas em ambiente peridoméstico (galinheiro), 83 exemplares ingurgitados de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia almerioi*. O presente estudo teve como objetivo a investigação do hábito alimentar para ave das fêmeas de ambas as espécies de flebotomíneos, mediante o emprego da técnica imunoenzimática de captura, comparando-se a reatividade durante os anos de 2002 a 2004. Dentre 57 amostras de *Lutzomyia longipalpis* e 26 de *Lutzomyia almerioi*, foram encontradas 72% reagentes para ave em *Lutzomyia longipalpis* e 96% em *Lutzomyia almerioi*, o que justifica o estudo do hábito alimentar na região, como medida de prevenção e instituição de vigilância epidemiológica.

Palavras-chaves: Identificação de sangue ingerido. *Lutzomyia longipalpis*. *Lutzomyia almerioi*. Técnica imunoenzimática de captura. Vetores.

Abstract

Lutzomyia longipalpis and *Lutzomyia almerioi*, phlebotomine species from the fauna of Serra da Bodoquena, in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, have been studied, particularly due to the fact of their abundance and occurrence, the Guaicurus settlement, focus of human tegumentary and canine visceral leishmaniasis. In researches that are being carried out in this settlement for identifying the vectors of these parasitosis, 83 engorged females belonging to the species *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia almerioi* were captured with automatic light traps from 2002 up to 2004 in the peridomiliary environment of the Guaicurus settlement (henery). The aim of this study was the investigation on bird feeding habit of females of both the phlebotomine species by the enzyme-linked immunosorbent assay technique, comparing the reactivity during the period from 2002 up to 2004. Of the 57 samples of *Lutzomyia longipalpis* and 26 of *Lutzomyia almerioi* that have been tested, 72% from *Lutzomyia longipalpis* and 96% from *Lutzomyia almerioi* were reactive, which justifies the feeding habit study in the region as a prevention measure and the institution of an epidemiological survey.

Key-words: Blood meal identification. *Lutzomyia longipalpis*. *Lutzomyia almerioi*. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Vectors.

1. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP. 2. Instituto Pasteur, São Paulo, SP. 3. Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 4. Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS, Brasil. Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Projeto 00/06811-0 e Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal/UNIDERP, Campo Grande, MS, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Ana Maria Marassá. Laboratório de Parasitoses Sistêmicas/Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo 355, 01246-902 São Paulo, SP. Tel: 55 11 3068-2891

Recebido para publicação em 27/12/2004

Aceito em 25/1/2006

A atração que diferentes animais silvestres e domésticos exercem sobre os flebotomíneos como fonte alimentar constitui-se em importante elemento para o conhecimento das relações hospedeiro - vetor nos diversos ambientes, sobretudo em se tratando de áreas com transmissão de leishmanioses.

Lutzomyia longipalpis, espécie incriminada com a principal vetora da leishmaniose visceral na América, vem sendo utilizada frequentemente em estudos experimentais de infecção e fisiologia⁶. Embora, seja frequentemente encontrada em abrigos de animais domésticos, pouco se conhece a respeito de seu comportamento alimentar^{2 5 8 9}.

Lutzomyia almerioi vem merecendo atenção por ser a espécie mais abundante da fauna associada a cavernas da Serra da Bodoquena, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, ser antropofílica, ter sido encontrada naturalmente infectada por flagelados e uma das mais frequentes em ambiente antrópico no Assentamento Guaicurus, foco de leishmaniose tegumentar humana e visceral canina localizado na vertente ocidental desta serra, no município de Bonito, onde sua frequência é superada apenas por *L. longipalpis*^{3 4}.

A partir de levantamento da fauna flebotomínea da região, verificou-se o encontro de casos humanos de leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral canina no Assentamento Guaicurus.

Este estudo tem como objetivo identificar o sangue ingerido em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* e de *Lutzomyia almerioi* pela técnica imunoenzimática de captura⁷ com a finalidade de validar a técnica para o estudo epidemiológico dessas doenças, visando auxiliar a identificação das espécies vetoras.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo. O Assentamento Guaicurus situa-se na vertente ocidental da parte central da Serra da Bodoquena, num vale, abrangendo área de 2.772ha, cujo desmatamento resultou na instalação de pequenas moradias com extensão de terreno destinada à lavoura e criação de animais com a finalidade de subsistência.

Amostras. Foram separadas ao acaso, 83 fêmeas ingurgitadas de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia almerioi* capturadas no período de 2002 a 2004, com armadilhas automáticas luminosas, quinzenalmente, instaladas no interior de galinheiro situado no ambiente peridoméstico de uma residência (lote n° 19) do Assentamento Guaicurus.

Das fêmeas, foram retiradas a cabeça e genitália para a identificação da espécie e o tórax e abdome foram acondicionados em microtubos e conservados em freezer a -20°C.

Para os controles positivo e negativo do teste, foram utilizados 60 exemplares de *L. longipalpis*, conforme descrito na padronização da técnica imunoenzimática de captura para a pesquisa do hábito alimentar em flebotomíneos⁷.

Preparo das amostras. O tórax e abdome dos exemplares coletados no campo, bem como os controles, foram macerados em 250µl de solução PBS-gelatina 0,1% (DIFCO). A seguir, foram centrifugados a 12.000rpm, por 5 minutos e os sobrenadantes

colhidos e processados para a identificação do sangue ingerido pela técnica imunoenzimática de captura.

Técnica imunoenzimática. Microplacas de 96 cavidades (Nunc®, Maxisorp, Denmark) foram sensibilizadas com 50µl/cavidade de anti IgG de ave (61-3.100, Zymed, USA), na concentração de 0,625µg/ml diluídas e incubadas a 4°C por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween20 (P-1379, Sigma, USA) por cinco vezes e os sítios livres bloqueados com 200µl/cavidade de PBS-gelatina 1%, por 3 horas à temperatura ambiente. Nesta etapa e nas demais, foi introduzida a gelatina como alternativa para a soroalbumina bovina, pois além de seu menor custo, também favorece a diminuição da inespecificidade do teste.

Após esse período e a cada etapa da reação, foram realizadas lavagens, segundo mencionado anteriormente, sendo a seguir adicionados 50µl/cavidade dos sobrenadantes das amostras, em duplicata, e dos controles positivo e negativo, sendo as microplacas incubadas a 4°C por 18 horas.

A seguir, acrescentou-se 50µl/cavidade de anti IgG de ave biotilado (61-3140, Zymed, USA) na concentração de 2µg/ml e as microplacas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem, foram adicionados 50µl/cavidade de avidina-fosfatase alcalina (A7294, Sigma, USA) na diluição de 1:60.000, permanecendo por mais uma hora à temperatura ambiente.

Como última etapa, foram adicionados 50µl/cavidade do substrato P-nitrophenil-phosphatase disodium (Sigma # 104-105) na concentração de 1mg/ml diluído em tampão dietanolamina 10%. A reação foi interrompida após 20 minutos, com adição de 100µl de NaOH 3N/cavidade e a leitura realizada em leitor de ELISA (Multiskan®EX) em comprimento de onda 405nm.

Análise estatística. Foram determinadas as médias, desvios padrão e variâncias para o cálculo do índice de positividade das amostras e os resultados foram analisados em nível de significância 5% ($p < 0,05$), sendo utilizado o programa Prism GraphPad versão 3.0.

RESULTADOS

Diferentes diluições das amostras foram previamente testadas na razão 2 e verificou-se que a diluição 1:2 foi a que melhor se adequou em relação à especificidade da técnica para as amostras de campo que apresentaram variabilidade em relação à ingestão de sangue.

O ponto de corte da reação foi estipulado pelo emprego de três vezes o valor da média das absorbâncias das amostras de exemplares machos, controle negativo do teste, sendo a absorbância específica igual ou maior a 0,417 considerada como valor positivo.

Os resultados referentes a positividade das amostras de campo de exemplares de *L. longipalpis* e de *L. almerioi* pelo método imunoenzimático de captura no período de 2002 a 2004, encontram-se representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Determinação pela técnica imunoenzimática de captura da positividade das amostras de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia almerioi* coletadas no período de 2002 a 2004 em galinheiro situado no peridomicílio de residência do Assentamento Guaicurus.

Amostras/Ano	<i>Lutzomyia longipalpis</i>		<i>Lutzomyia almerioi</i>		P	Total
	R	NR	R	NR		
2002	10	10*	16	1	0,013	37
2003	23*	3	9	0	0,566	35
2004	8	3	-	-	-	11
Total	41	16	25	1	0,040	83

*Fêmeas contendo ovos R= Reagentes NR =Não Reagentes

As médias, desvios padrão e variâncias das absorbâncias de amostras de *L. longipalpis* coletadas no campo, as criadas em laboratório, bem como, de *L. almerioi* procedentes de campo no período de 2002 a 2004 estão representados na Tabela 2.

A Tabela 3 apresenta o nível de significância encontrado entre a variação das absorbâncias de amostras de *L. longipalpis* e *L. almerioi* comparadas entre os anos de 2002, 2003 e/ou 2004, constatando-se que apenas as absorbâncias entre os anos de 2002 e 2003 em *L. almerioi* não apresentaram diferença significativa.

De 57 exemplares de *L. longipalpis* e de 26 de *L. almerioi* coletados no campo, no período de 2002 a 2004, foram encontradas 72% de amostras reagentes para ave em *L. longipalpis* e 96% em *L. almerioi*, observando-se diferença significativa entre a positividade das amostras das duas espécies ($\chi^2 = 6,43$), $p = 0,040$. Quando se observou isoladamente os anos de 2002 e 2003, verificou-se no período de 2002, diferença estatisticamente significativa entre a reatividade das amostras de *L. longipalpis* e *L. almerioi* para sangue ingerido em ave, no entanto, no período de 2003 não houve diferença significativa.

Tabela 2 - Distribuição das médias, desvios padrão e variâncias das absorbâncias de amostras de *Lutzomyia longipalpis* coletadas no campo, alimentadas em laboratório e de *Lutzomyia almerioi* procedentes de campo no período de 2002 a 2004.

Amostras/Ano	Local	<i>Lutzomyia longipalpis</i>			<i>Lutzomyia almerioi</i>		
		X	S	V	X	S	V
2002	campo	0,518	0,247	0,061	0,781	0,167	0,028
	laboratório	0,815	0,030	0,001	-	-	-
2003	campo	0,652	0,148	0,022	0,764	0,031	0,001
2004	campo	0,668	0,197	0,039	-	-	-

X = média; S = desvio-padrão; V = variância

Tabela 3 - Comparação da variação das absorbâncias de amostras de *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia almerioi* segundo o local de ingestão e período.

Amostras	Local	Ano	x	Amostras	Local	Ano	Amostras	Local	Ano	p	
<i>L. longipalpis</i>	campo	2002	x	<i>L. almerioi</i>	campo	2002	-	-	-	0,000	
<i>L. longipalpis</i>	campo	2003	x	<i>L. almerioi</i>	campo	2003	-	-	-	0,044	
<i>L. almerioi</i>	campo	2002	x	<i>L. almerioi</i>	campo	2003	-	-	-	0,052	
<i>L. longipalpis</i>	campo	2002	x	<i>L. longipalpis</i>	laboratório	2002	-	-	-	0,000	
<i>L. longipalpis</i>	campo	2002	x	<i>L. longipalpis</i>	campo	2003	x	<i>L. longipalpis</i>	campo	2004	0,034

x = versus

DISCUSSÃO

As técnicas imunológicas têm sido freqüentemente utilizadas para a investigação e identificação de repastos sangüíneos em diversas espécies de dípteros. Com maior sensibilidade e especificidade, a técnica imunoenzimática de captura tem sido a mais indicada para a detecção de sangue ingerido por pequenos dípteros, mais especificamente de flebotomíneos e culicídeos^{1 7 9 11 12}.

A identificação de uma proteína marcada para o reconhecimento da especificidade do teste é determinada de acordo com o objetivo que se deseja atingir e também, é dependente da técnica empregada. Service e cols¹¹ e Quinnel e cols⁹, consideraram IgG espécie específica como melhor indicador para o reconhecimento de sangue ingerido em flebotomíneos, a qual também foi utilizada no presente estudo. Com o emprego desta imunoglobulina observou-se maior sensibilidade da técnica, quando da aplicação do sistema avidina-biotina, sendo possível a detecção de sangue ingerido em todas as amostras de *L. longipalpis* criadas em laboratório, acondicionadas em freezer a -20°C por 2 anos consecutivos, bem como a presença de sangue em fêmeas contendo ovos (Tabela 1), sem que houvesse degradação gradual ou destruição de proteínas durante o período de acondicionamento.

Ao comparar a média das trinta fêmeas de *L. longipalpis* criadas em laboratório com exemplares coletados no campo, do mesmo ano, observou-se diferença significativa entre as amostras. Esta diferença, provavelmente, seja explicada pela quantidade de sangue ingerido nas amostras de *L. longipalpis*, que nos alimentados em laboratório, apresentavam em torno de ¾ e nas amostras de campo, nos diferentes anos, variou de ¼ a ¾ do conteúdo abdominal. Resultados semelhantes foram apontados¹⁰ para *Aedes albopictus* coletados no campo.

Durante o período de capturas realizadas em um único local, *L. longipalpis* apresentou diferentes padrões de reatividade, o que é sugestivo de alternância desta espécie quanto à fonte alimentar.

Neste estudo, a inclusão de fêmeas com presença de ovos deveu-se aos resultados encontrados em identificações de fonte alimentar em exemplares da espécie *Aedes cantans*, *Aedes punctator* e *Culicoides obsoletus*, que apresentaram ovos e sangue em ¾ do conteúdo abdominal¹¹.

A presença praticamente homogênea ao longo do período de 2002 e 2003 em torno de ¾ de sangue do conteúdo abdominal com 96% de reatividade em fêmeas de *L. almerioi* possivelmente explique a não diferenciação significativa das médias das absorbâncias (Tabela 2). O mesmo não se verificou para *L. longipalpis* que embora apresente maior porte do que as de

Lutzomyia almerioi a quantidade de sangue ingerido teve uma maior variação.

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a identificação de repastos sanguíneos em flebotomíneos, o que dificulta a comparação com os resultados deste estudo. No entanto, os resultados de reatividade obtidos neste estudo, 72% para *Lutzomyia longipalpis* com quantidades mais heterogêneas variando de $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ de sangue no conteúdo abdominal e 96% de *L. almerioi* com valores mais homogêneos em torno de $\frac{3}{4}$, quando comparados aos de Svobodová e cols¹², que obtiveram 73% de reatividade em amostras contendo aproximadamente $\frac{3}{4}$ de sangue ingerido, utilizando a técnica imunoenzimática de captura no sistema peroxidase, apontam para uma maior sensibilidade do sistema fosfatase alcalina avidina-biotina empregado no presente estudo.

Com esta técnica, pode-se constatar pela primeira vez, a identificação de sangue ingerido em fêmeas de *L. almerioi* e foi perceptível a diferença na quantidade de sangue ingerido pelas desta espécie em relação às *L. longipalpis* (refletidas nas médias) sugerindo que no ambiente investigado esta última possa ser mais eclética em relação à fonte alimentar, com implicações na cadeia epidemiológica das leishmanioses.

Com respeito à presença de animais no ambiente peridoméstico, este fato remete implicações, em virtude da proximidade em relação ao habitat humano e do possível favorecimento à abundância dos flebotomíneos e conseqüente manutenção da transmissão das leishmanioses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Maria Dulce Bianchi Rosa pelo apoio laboratorial e à Maria das Graças Silva por normatizar o texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Colmenares M, Portús M, Botet J, Dobaño C, Gállego M, Wolff M, Seguí G. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *Journal of Medical Entomology* 32: 229-233, 1995.
- Dias FOP, Lorosa ES, Rebêlo JMM. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). *Cadernos de Saúde Pública* 19: 1373-1380, 2003.
- Galati EAB, Nunes VLB, Boggiani PC, Dorval MEC, Cristaldo G, Rocha HC, Oshiro ET, Gonçalves de Andrade RM, Naufel G. Phlebotomines (Diptera, Psychodidae) in caves of the Serra da Bodoquena, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 283-296, 2003.
- Galati EAB, Nunes VLB, Cristaldo G, Rocha HC. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 32: 235-261, 2003.
- Lainson R, Shaw JJ, Ryan L, Ribeiro RSM, Silveira FT. Leishmaniasis in Brazil. XXI Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 223-226, 1985.
- Lewis DJ, Ward RD. Transmission and vectors. In: Peters, W Killick-Kendrick R (eds) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London, volume 1, p. 235-262, 1987.
- Marassá AM, Consales CA, Galati EAB. Padronização da técnica imunoenzimática do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação de sangue ingerido por *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 37: 441-446, 2004.
- Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of American visceral leishmaniasis in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 68-75, 1993.
- Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazon Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* 6: 195-200, 1992.
- Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig Jr GB. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) at temperate North American site. *Journal of Medical Entomology* 30: 27-34, 1993.
- Service MW, Voller A, Bidwell DE. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haematophagous insects. *Bulletin of Entomological Research* 76: 321-330, 1986.
- Svobodová M, Sádlová J, Chang K-P, Volf P. Distribution and feeding preference of the sandflies *Phlebotomus sergenti* and *Phlebotomus papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *The American Journal of Tropical medicine and Hygiene* 68: 6-9, 2003.