

Prevalência da microbiota no trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) provenientes do campo

Prevalence of the microbiota in the digestive tract of wild-caught females of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae)

Sandra Maria Pereira de Oliveira¹, Bianca Aguiar de Moraes², Claudia Abrantes Gonçalves¹,
Cristina Maria Giordano-Dias¹, José Mario d'Almeida³, Marise Dutra Asensi²,
Rubens Pinto Mello¹ e Reginaldo Peçanha Brazil⁴

Resumo No presente trabalho foram dissecados o trato digestivo de 245 fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* originários da Gruta da Lapinha, Município de Lagoa Santa, MG, formando 7 grupos de 35 flebotomíneos. Das 8 espécies de bactérias isoladas houve uma predominância de bactérias Gram negativas (BGN) pertencentes ao grupo de não fermentadoras de açúcar das seguintes espécies: *Acinetobacter lowffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* e *Flavimonas orizihabitans*. No grupo das fermentadoras tivemos: *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella ozaenae*. No grupo dos Gram positivos foram identificados *Bacillus thuringiensis* e *Staphylococcus* spp.

Palavras-chaves: *Lutzomyia longipalpis*. Flebotomíneos. Bactérias.

Abstract We dissected the digestive tract of 245 females in pools of 35 flies forming 7 groups. These flies were *Lutzomyia longipalpis* originating from Lapinha Cave, Lagoa Santa, Minas Gerais. Out of the 8 species of bacteria isolated there was a predominancy of Gram negative bacterias (GNB) in the group of non-fermenters of sugar belonging to the following species: *Acinetobacter lowffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* and *Flavimonas orizihabitans*. The group of GNB fermenters were: *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella ozaenae*. In the Gram positive group we isolated the genera *Bacillus thuringiensis* and *Staphylococcus* spp.

Key-words: *Lutzomyia longipalpis*. Sandflies. Bacterias.

Bactérias têm sido identificadas no trato digestivo de várias espécies de insetos³², e em algumas espécies, elas podem interferir no desenvolvimento de parasitos de importância médica transmitidos por insetos^{4,26}. Em insetos criados em laboratório a presença de bactérias no trato digestivo ocorre com mais frequência, acarretando alto índice de mortalidade^{1,2,9,14}.

Flebotomíneos em condições naturais, são capazes de controlar um número limitado de bactérias, pois seu mecanismo de defesa é ineficiente contra infecções maciças²⁷. Esse mecanismo, não só é responsável por proteger esses vetores contra infecções no intestino, como também é um fator essencial para a susceptibilidade de flebotomíneos em albergar *Leishmania* spp^{1,2,29}.

1. Departamento de Entomologia, 2. Departamento de Bacteriologia, 3. Departamento de Biologia do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ e 4. Centro de Pesquisa René Rachou da FIOCRUZ, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Dr. Reginaldo Peçanha Brazil. Laboratório de Leishmanioses/CPqRR/FIOCRUZ. Av. Augusto de Lima 1715, 30190-002 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Fax: 55 31 295-3115.

e-mail: rpbrasil@cpqrr.fiocruz.br

Recebido para publicação em 15/3/99.

Em condições naturais, fêmeas de flebotomíneos, além de exercer a hematofagia, alimentam-se de açúcares, derivados de várias fontes (folhas, frutos e secreções de afídeos), onde têm a oportunidade de ingerir microrganismos^{10 17 28}.

No presente estudo são identificadas bactérias do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, na natureza, o que irá subsidiar estudos futuros tanto ao nível de campo como experimental, de laboratório.

L. longipalpis foram capturados com armadilha luminosa tipo CDC, externamente, na Gruta da Lapinha, município de Lagoa Santa, MG e levados ao laboratório no Departamento de Biologia/ Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/RJ sem qualquer tipo de alimento. Para os estudos bacteriológicos foram usados meios de cultura desidratados, da marca DIFCO, adotando-se as instruções, no preparo, distribuição e esterilização, bem como, o Sistema de Identificação de Fermentadores e Não Fermentadores Crystal Enteric (Becton & Dickinson Microbiology Systems EUA).

Foram dissecadas 245 fêmeas reunidas em 7 grupos, formando um *pool* de 35 insetos por grupo, das quais, extraímos o trato digestivo (tubo digestivo e tubos de Malpighi). As fêmeas foram selecionadas e colocadas no congelador, por alguns minutos, para diminuir as atividades vitais e facilitar o manuseio. Posteriormente, foram processadas em câmara de fluxo laminar, submetidas a 1 lavagem em hipoclorito de sódio a 5% e 2 passagens em água destilada estéril¹³. Ainda na câmara de fluxo laminar, os insetos foram dissecados em salina estéril e os tratos digestivos obtidos mergulhados em caldo simples, onde foram macerados. O material foi semeado em placa de agar columbia contendo 5% de sangue

desfibrinado de carneiro (agar-sangue); agar xilose-lisina-descarboxilase (AXLD), agar eosina-azul de metileno (AEMB), aAgar hektour (AHK), agar cetrimide e em caldo tioglicolato. Os meios permaneceram em estufa, incubados à temperatura de 37°C por 24 a 48 horas. A partir do crescimento bacteriano obtido em caldo tioglicolato, foram realizadas novas sementeiras, seguindo o mesmo procedimento^{18 21}.

A caracterização primária dos microrganismos foi obtida através dos aspectos gerais das colônias, coloração pelo método de Gram, bem como pelos resultados obtidos nos testes bioquímicos de triagem. Os microrganismos Gram-negativos foram caracterizados utilizando os meios básicos de Costa e Vêrnin (CV), meio de sulfeto-indol-motilidade (SIM) e citrato de Simmons²².

A identificação das espécies de bactérias baseou-se nos dados das provas bioquímicas, fisiológicas, destacando-se a capacidade de fermentação de açúcares (glicose, sacarose e manitol; produção de descarboxilases (lisina, arginina e ornitina) e desoxiribonuclease (DNase). Além do Sistema de Identificação de Fermentadores e Não Fermentadores Crystal (BBL) na classificação final^{5 7 8 15 18 21 22}.

Das 8 espécies isoladas do trato digestivo e tubos de Malpighi (Figura 1), foram predominantes os bacilos Gram negativos (BGN) pertencentes ao grupo dos não fermentadores de açúcares, representados por: *Acinetobacter lwoffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* e *Flavimonas orizihabitans*. O grupo dos BGN, fermentadores foram *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella ozaenae*. As espécies de bactérias Gram positivas foram: *Bacillus thuringiensis* e *Staphylococcus spp*.

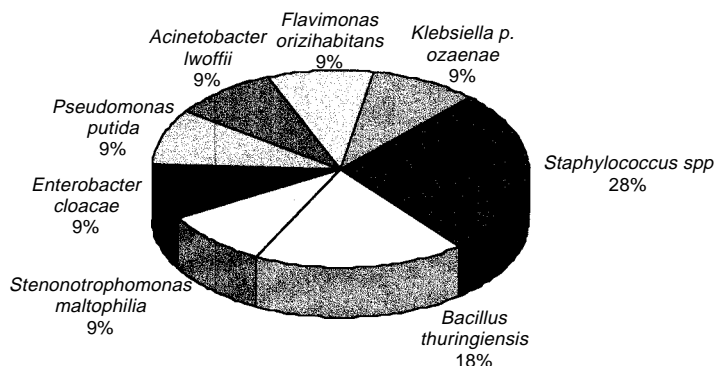


Figura 1 - Espécies bacterianas isoladas de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* provenientes do campo.

Com os resultados obtidos, a partir de fêmeas de *L. longipalpis* capturadas na Gruta da Lapinha, MG, observou-se uma diversidade na população bacteriana nesses flebotomos à semelhança do que fora encontrado em *Phlebotomus papatasi* no Egito¹² e em menor número, quando comparada com *Musca* and *Glossina*^{25 31}.

Dentre as 8 espécies de bactérias isoladas pertencente a família Enterobacteriaceae, *Klebsiella p. ozaenae* já foi isolada de mosquitos do gênero *Culex*, *Aedes* e *Psorophora* sendo ela considerada como patógeno^{11 16 30}. A espécie *Enterobacter cloacae* também foi identificada em outros insetos³² sendo a espécie mais comumente encontrada no intestino de insetos de importância médica, inclusive em flebotomíneos criados em laboratório²⁴.

Os bastonetes Gram negativos (BGN), não fermentadores de açúcares, identificados em *Lutzomyia longipalpis*, representado por *Acinetobacter Iwoffii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida* e *Flavimonas orizihabitans*, também já foram assinalados por vários autores em diferentes insetos^{12 13 23}.

A espécie *Bacillus thuringiensis* (Gram positiva) foi detectada em 18% das fêmeas

dissecadas. Esta espécie também foi isolado do trato digestivo e tubos de Malpighi de machos de *Lutzomyia longipalpis*, em condições experimentais (observações não publicadas) e em *Aedes triseriatus*¹¹. *Bacillus thuringiensis* variedade *israeliensis* (*B.t.i.*) tem sido um eficiente agente de controle biológico de uma grande variedade de insetos, principalmente, dípteros hematófagos que têm desenvolvimento de formas imaturas em água^{19 20}. Fêmeas *P. papatasi* alimentadas em diferentes fontes de açúcares tornam-se suscetíveis a ação do (*B.t.i.*)³⁴. Larvas de *P. papatasi* e *L. longipalpis* foram suscetíveis ao *B.t.i.*, cuja toxicidade foi comprovada em adultos de *P. papatasi*, *P. argentipes*, *P. perniciosus* e *L. longipalpis*^{3 33}.

Espécies não identificadas de *Staphylococcus* (Gram-positivos) foram encontrado também em *P. tobbi*²⁹ e em mosca do gênero *Cochliomyia*⁸. Cocos Gram-positivos foram descritos no trato digestivo de *P. papatasi* em condições naturais¹².

Com o presente estudo, é possível admitir as espécies de bactérias dos gêneros: *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*, possam fazer parte da flora do trato digestivo de fêmeas de *L. longipalpis*, em condições naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S, Theodor O. The transmission of *Leishmania tropica* from artificially infected sandflies to man. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 21:88-110, 1927a.
- Adler S, Theodor O. Attempts to transmit *Leishmania tropica* by bite: the transmission of *L. tropica* by *Phlebotomus sergpti*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 23:1-18, 1927b
- Barjac H, Larget I, Killick-Kendrick R. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis*, sérotype Hi4, pour les larves de phlébotomes, vecteurs de leishmanioses. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 74:485-489, 1981.
- Beier MS, Pumpuni CB, Beier JC, Davis JR. Effects of para-aminobenzoic acid, insulin, and gentamicin on *Plasmodium falciparum* development in anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 31:561-565, 1994.
- Bruckner DA, Colonna P. Nomenclature for Aerobic and Facultative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 25:1-10, 1997.
- Caballero M, Hernandez G, Poudevigne F, Ruiz-Martinez I. Isolation and Identification of Bacteria Associated with the Screwfly *Cochliomyia hominivorax*, Coquerel and Its Myiasis. *Annals of New York Academy of Science* 23:248-254, 1996.
- Caiaffa Filho HH, Mendes CM. Identificação das bactérias Gram-negativas não fermentadoras da glicose (1ª de 2 partes). *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 22:213-221, 1986.
- Caiaffa Filho HH, Mendes CM. Identificação das bactérias Gram-negativas não fermentadoras da glicose (2ª de 2 partes). *Revista Brasileira de Patologia Clínica* 23:12-17, 1987.
- Cameron MM, Milligan PJM, Llanoscuentea AS, Davis CR. An association between phlebotomine sandflies and aphids in the Peruvian Andes. *Medical and Veterinary Entomology* 9:127-132, 1995a.
- Cameron MM, Pessoa FA, Vasconcelos AW, Ward RD. Sugar meal sources for the phlebotomine sandflies *Lutzomyia longipalpis* in Ceará State, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* 9:263-272, 1995b.
- Demaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC. The bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens* and *Psorophora columbiana* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54:219-223, 1996.
- Dillon RJ, El Kordy E, Lane RP. The prevalence of microbiota in the digestive tract of *Phlebotomus papatasi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 90:669-673, 1996.

13. Figueiredo AR. *Isolamento da microbiota bacteriana de triatomíneos e persistência do Enterobacter cloacae em Rhodnius prolixus Stal, 1859*. Tese de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 1-72 1995.
14. Figueiredo AR, Oliveira SMPde, Gordano-dias CM, d'Almeida JM, Brazil RP. Presença de *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* em colônias de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). *16º Congresso Brasileiro de Entomologia. VII ENFIT- Encontro Nacional de Fitossanitaristas*. Salvador -BA 1997.
15. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of determinative bacteriology*. 9th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.
16. Jadin J. Du role des bacteries dans le tube digestif des insectes vecteurs des plasmodidae et des Trypanosomidae. *Annales de Societé Belgique de Medicine Tropicale* 47:331-342, 1967.
17. Killick- Kendrick R, Killick- Kendrick M. Honeydew of aphids as a source of sugar for *Phlebotomus ariasi*. *Medical and Veterinary Entomology* 1:297-302, 1987.
18. Koneman EW, Allen SD, Dowel JRV, Sommes HM. *Diagnóstico microbiológico: Texto e bas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 2ª edição. Panamericana, São Paulo, 1993.
19. Lacey LA, Federicl BA. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 33: 171-182 1979.
20. Lacey LA, Undeen AH. Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annual Review of Entomology* 31: 265-296 1986.
21. Lennette EH, Balows A, Shadomy HJ. *Manual of clinical microbiology*. 4th edition, ASM Press, Washington, DC, 1985.
22. Mac-Fadin A. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 2ª edição. Panamericana, São Paulo, 1993.
23. Moore GF. Mortality Factors Caused by Pathogenic Bacteria and Fungi of the Southern Pinee Beetle in North Carolina. *Journal of Invertebrate Pathology* 17:28-37, 1971.
24. Oliveira SMP, Loureiro MM, Leandro MJF, Giordano-Dias CM, Brazil RP, d'Almeida JM, Asensi MD, Mello RP. Caracterização da microbiota do trato digestivo de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae) alimentadas com frutose. *Entomologia y Vectores* 6:166-179, 1999.
25. Pell PE, Southern DI. Symbionts in the Female Tsetse Fly *Glossina morsitans morsitans*. *Experientia* 31:650-651, 1975.
26. Pumpuni CB, Demaio J, Kent M, Davis JR, Beier JC. Bacterial population Dynamics in three Anopheline species: The impact on *Plasmodium sporogonic* development. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54:214-218, 1996.
27. Schlein Y, Muller G. Assessment of plant tissue feeding by sandflies (Diptera: Psychodidae) and mosquitos (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 32:882-888, 1995.
28. Schlein Y, Yuval B. Leishmaniasis in the Jordan Valley. IV. Attraction of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to plants in the field. *Journal of Medical Entomology* 24:87-90, 1987.
29. Schlein Y, Polacheck, Yuval B. Mycoses, bacterial infection and antibacterial activity in sandflies (Psychodidae) and their possible role in the transmission of leishmaniasis. *Parasitology* 90:57-66, 1985.
30. Seitz HM, Maier WA, Rottok M, Becker-Feldmann H. Concomitant infections of *Anopheles stephensi* with *Plasmodium berghei* and *Serratia marcescens*: additive detrimental effects. *Zentralbl Bakt Hygiene* 266:155-166, 1987.
31. Szabó I, Marton M, Buti I, Pártai G. Intestinal microflora of the larvae of St. Mark's fly. *Acta Microbiological Academici Scienci Hung.* 13:47-52, 1966.
32. Tanada Y, Kaya HKI. *Insect Pathology*. Academic Press. New York. 12-51, 1993.
33. Yuval B, Warburg A. Susceptibility of adult phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) to *Bacillus thuringiensis* var. israeliensis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83:195-196, 1989.
34. Yuval B, Warburg A, Schlein. Leishmaniasis in the Jordan Valley. V. Dispersal characteristics of the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Medical and Veterinary Entomology* 2:391-395, 1988.