

Estudos de preferência alimentar de *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): II. Ampliação do banco de anti-soros e implantação de técnica imunoenzimática

Renata Wanderley NOGUEIRA¹; Antonia Maria Ramos FRANCO²; Liliane Coelho da Rocha NERY³; Francimeire Gomes PINHEIRO³; Karina Câmara MOTA³

¹Bolsista PIBIC INPA/CNPq; ²Orientador INPA/CPCS; ³Colaboradores INPA/CPCS.

Na região Norte, o número de casos humanos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerado um dos mais elevados do Brasil. No Estado do Amazonas, Manaus, seguido de Rio Preto da Eva, são os municípios com maior incidência da doença (FVS, 2005). Uma grande riqueza de espécies de flebotomíneos, assim como de transmissores da LTA já foram registrados nestes municípios. A determinação da fonte sanguínea dos insetos hematófagos ajuda a entender os ciclos de vida dos patógenos, seus hospedeiros potenciais, sua importância na cadeia epidemiológica e para o delineamento de estratégias de controle destes vetores (Boreham, 1975, Tempelis, 1975, Ngumbi *et al.*, 1992). Dos métodos empregados para esclarecer a atração de vetores por animais que possam atuar como reservatórios dessas parasitoses, destacam-se os imunológicos. Diferentes autores já empregaram a técnica imunoenzimática para o conhecimento de fonte alimentar em flebotomíneos (Ngumbi *et al.*, 1992; Comer *et al.*, 1994; Yaghoobi-Ershadi *et al.*, 1995). Este estudo teve como objetivo, padronizar a técnica imunoenzimática - ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e testar amostras de sangue ingerido em fêmeas de *Lutzomyia umbratilis* ingurgitadas, coletadas em base de árvore na BI1 - Base de instrução do CIGS, Km 65 - Manaus/Rio Preto da Eva. Para a realização dos testes foi necessária a produção de anti-soros (Ig - imunoglobulinas totais) obtidos através da imunização de coelhos com proteínas precipitadas de soros específicos de diversas espécies de animais da região. No processo de imunização foram utilizados dois coelhos para cada um dos oito soros utilizados - **Primata:** *Homo sapiens*; **Edentados:** *Dasyus novencinctus*; **Carnívora:** *Canis familiares*, *Poto flavus*; **Rodentia:** *Rattus rattus*, *Proechimys guyanensis*; **Marsupialia:** *Didelphis marsupialis* e **Galliformes:** *Gallus gallus*. Os soros foram precipitados com sulfato de amônio saturado e a concentração de proteínas estimada pelo método de Bradford (1979). No esquema de imunização foram realizadas quatro injeções (a primeira intramuscular e as outras pela via intradérmica) com diferentes concentrações protéicas (média de 2 a 3mg/ proteína total/coelho). Nas duas primeiras doses foram utilizados adjuvantes completo e incompleto de Freund, respectivamente. Durante a imunização foi coletado sangue dos coelhos imunizados para reação de imunodifusão dupla radial a fim de observar o padrão de identidade da resposta imune nestes animais. Após o período de imunização (39 dias), realizou-se sangria total mediante punção cardíaca sendo o soro estocado a -20°C. Seguiu-se a este processo a padronização da reação (concentração mínima reativa de soros homólogos, titulação dos anti-soros e verificação de reações cruzadas) e por último, um teste preliminar de preferência alimentar através do ELISA. Este teste, foi realizado em microplacas de 96 poços (Nunc@ Maxisorp, Denmark), utilizando-se o conjugado de peroxidase Ig de cabra anti IgG de coelho (Sigma) numa diluição de 1/26000 em substrato de OPD (o-phenylenediamine/Sigma) numa concentração de 0,5mg/mL em tampão citrato (pH 5,0) sendo a leitura realizada em leitor de ELISA (Bio-Tek) em comprimento de onda de 490nm. Os insetos utilizados nos ensaios foram coletados em base de árvore na BI1 - Base de instrução do CIGS, Km 65 - Manaus/Rio Preto da Eva. Trinta fêmeas de *L. umbratilis* ingurgitadas com sangue foram identificadas utilizando-se a chave taxonômica de Young & Duncan (1994). Para a realização do teste, os abdômens das fêmeas foram coletados e acondicionados individualmente em solução salina a -20°C. Para o controle negativo, foram coletados machos da mesma espécie. Verificou-se reatividade dos anti-soros aos soros homólogos, sendo determinada a concentração dos anti-soros em 8 ug/mL. Também foi estabelecido que os soros foram reativos em todas as diluições (Figura), sendo mais informativo em mínimas concentrações. Num dos testes preliminares, verificou-se reatividade pelo ELISA ao anti-soro de rato para uma das fêmeas de *L. umbratilis*. A atração de fêmeas de flebotomíneos em relação ao homem e aos animais domésticos tem sido alvo de vários estudos para a investigação da frequência e especificidade do contato hospedeiro - vetor, que se reflete como fator de risco na transmissão das leishmanioses (Marassá *et al.*, 2004). O emprego de técnicas imunológicas no estudo de preferência alimentar pode acrescentar novos conhecimentos ao quadro epidemiológico de parasitoses.

Teste de Elisa - titulação de anti-soro

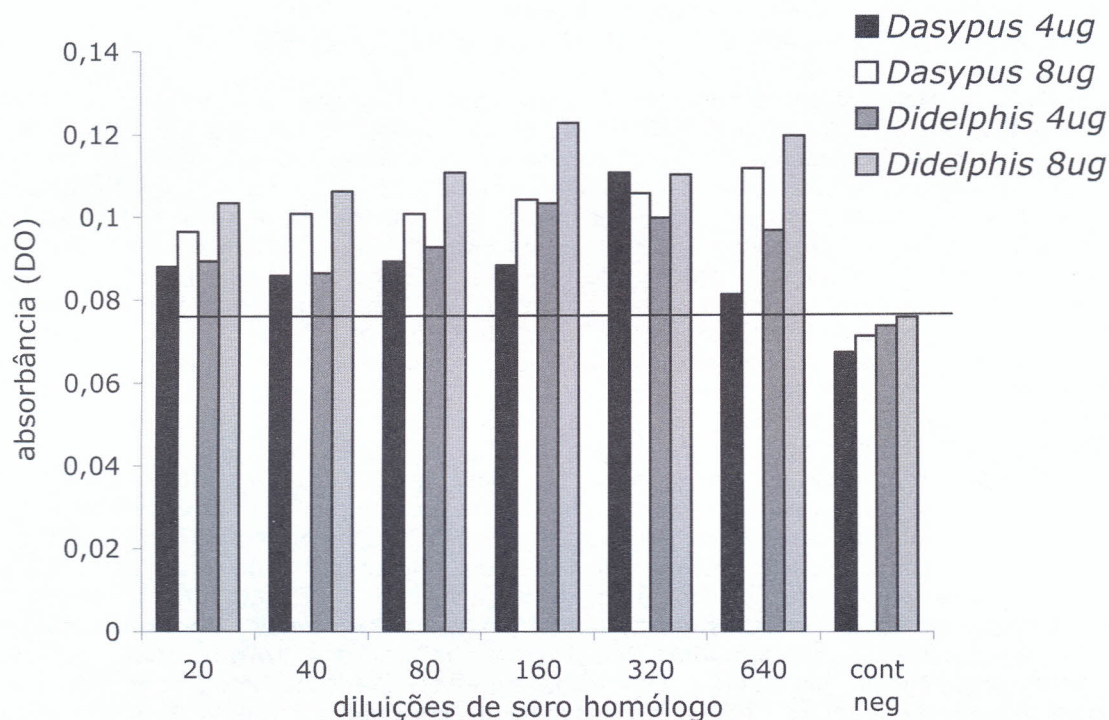


Figura. Determinação da titulação de anti-soro de *Didelphis marsupialis* e *Dasypus novencinctus* e concentração de soro homólogo reativo.

Palavras-chave: *Lutzomyia* – Preferência alimentar – Elisa

Bibliografias citadas

Boreham, P.F.L. 1975. Some application of bloomeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical disease. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 83-91;

Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Annals Biochemistry* 72: 248-254;

Comer, J.A.; Irby, W.S.; Kavanaugh, D.N. 1994. Hosts of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia, USA. *Medical of Veterinary Entomology* 8: 325-330.

Fundação de Vigilância em Saúde (FVS) – Departamento de Vigilância Epidemiológica/SINAN-AM, 2005.

Marassá, A.M.; Consales, C.A.; Galati, A.B. 2004. Enzyme-linked Immunosorbent Assay biotin/avidin method standardization, for identification of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* bloodmeals (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(6): 441-446;

Ngumbi, P.M.; Lawyer, P.G.; Johson, R.N.; Kilu, G.; Asiago, C. 1992. Identification by phlebotominae sandflies bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Medicina Veterinária de Entomologia*, 6: 385-388;

Tempelis, C.H. 1975. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *Journal of Medicine and Entomology*, 11: 635-653;

Yaghoobi-Ershadi, M.R.; Javadian, E.; Kannani, A. 1995. Host preference pattern of phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran. *Acta Tropica*, 60: 155-158;

Young, D.G.; Duncan, M.A. 1994. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*, 54:881.