

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA
(ELISA) DE CAPTURA PARA O ESTUDO DO HÁBITO
ALIMENTAR DE DÍPTEROS DA SUBFAMÍLIA
PHLEBOTOMINAE**

ANA MARIA MARASSÁ

**Dissertação de Mestrado Apresentada ao
Departamento de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Grau de Mestre.**

Área de Concentração: Epidemiologia

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. EUNICE
APARECIDA BIANCHI GALATI**

SÃO PAULO

2003

Aos meus pais Horacio e Jacyra (in memoriam)

Somos todos viajantes de uma jornada cósmica-
poeira de estrelas, girando e dançando nos torvelinhos
e redemoinhos do infinito. A vida é eterna. Mas suas
expressões são efêmeras, momentâneas, transitórias.

Nós paramos um instante para encontrar o outro,
para nos conhecermos, para amar e compartilhar. É
um momento precioso, mas transitório. Um pequeno parênteses na eternidade.
Se partilharmos carinho, sinceridade, amor, criamos abundância e alegria para todos
nós.
Esse momento de amor é valioso.

Deepak Chopra

AGRADECIMENTOS

A DEUS que iluminou meu caminho;

À Profª. Dra. EUNICE APARECIDA BIANCHI GALATI, pela orientação, confiança e apoio neste trabalho.

Às amigas CLEIDE ASCHENBRENNER CONSALES, Pesquisador Científico e MARIA DAS GRAÇAS SILVA, Auxiliar de Biblioteca, do Instituto Pasteur, pela colaboração e incentivo.

Ao INSTITUTO EVANDRO CHAGAS, Belém, Pará, em nome do Dr. ADELSON ALMEIDA DE SOUZA e Sr. JOSÉ APRÍGIO NUNES LIMA pela doação da colônia de *Lutzomyia longipalpis* que deu origem a este trabalho.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP) projeto 00/06811-0 pelo fornecimento dos reagentes utilizados.

Às amigas EDNA FÁTIMA MARIA BUENO, MARIA DULCE BIANCHI ROSA, da Faculdade de Saúde Pública/USP e RUTE MARIA GONÇALVES DE ANDRADE, Pesquisadora do Instituto Butantan pela colaboração na obtenção das amostras.

Ao Prof. Dr. DELSIO NATAL, do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública/USP pela foto da padronização.

Ao INSTITUTO ADOLFO LUTZ por ter permitido a realização deste trabalho.

RESUMO

A identificação de sangue ingerido pelos insetos constitui-se em importante parâmetro para elucidar aspectos ligados à transmissão de zoonoses, dentre elas, as leishmanioses.

Dentre alguns métodos empregados para esclarecer a atração de vetores por animais que possam atuar como reservatórios dessas parasitoses, destacam-se os métodos sorológicos.

O presente estudo teve como objetivo, padronizar a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, a ser utilizada em pesquisas relacionadas à atração de vetores das leishmanioses.

Para a padronização da técnica, foram utilizadas fêmeas de flebotomíneos ingurgitadas da espécie *Lutzomyia longipalpis*, criadas em laboratório em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, alimentadas experimentalmente em rato e com a utilização de reagentes disponíveis no comércio.

Em vista da alta sensibilidade, favorecida pelo sistema avidina-biotina, quantificou-se sangue ingerido para amostras com diferentes períodos de digestão, utilizando-se a menor concentração de anti-soro.

A técnica pôde prover a realização de pelo menos noventa testes em duplicata para a determinação de sangue recém-ingerido.

Para todas as amostras com períodos de 12 e 24 horas pós-ingestão, foi constatada a presença de sangue, observando-se diferença significativa entre os

respectivos títulos, com a possibilidade de detecção de sangue até 48 horas e observada a ausência total de reação após 72 horas da ingestão de sangue.

DESCRITORES: Identificação de sangue ingerido, *Lutzomyia longipalpis*, Phlebotominae, técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, vetores.

SUMMARY

Blood meals taken by insects constitute an important parameter for the elucidation of aspects of the transmission of the zoonoses, and among them, the Leishmaniasis.

Among the methods used in the investigation of the attraction of those animals, which may be hosts of these parasites, exercised over vectors, are the immunological assays.

This study was undertaken for the purpose of standardizing a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to be employed in research projects related to leishmaniasis vectors' attraction to animals.

Laboratory-bred sandflies, *Lutzomyia longipalpis*, fed on rats and maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, and commercial reagents, were employed.

In the light of the high sensibility that the biotin-avidin method permits, samples with different time periods of digestion were quantified, by means of the smallest concentration of antisera.

The technique provided at least ninety repeat tests to determine recent blood meals taken by these insects.

Blood meals were detectable up to 12 and 24h after feeding, and a significant difference between these times was observed, with the possibility of detecting blood meals up to 48h after ingestion and the total absence of reaction 72 h thereafter.

DESCRIPTORS: Blood meal identification, *Lutzomyia longipalpis*, Phlebotominae, sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), vectors.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MÉTODO	14
3.1 Amostras	14
3.1.1 Preparo das amostras	15
3.1.2 Material utilizado para padronização do teste (ELISA) de captura	15
3.2 PADRONIZAÇÃO DO TESTE	17
3.3 Cinética de ingestão de sangue por <i>Lutzomyia longipalpis</i>	19
3.4 Análise Estatística	19
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Das doenças veiculadas por artrópodes, as Leishmanioses ocupam o segundo lugar em importância entre as protozooses, com magnitudes que permitem considerá-las, no presente, como relevantes agravos em Saúde Pública (LAINSON et al. 1986).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde, 12 milhões de casos de infecção por *Leishmania* sp são relatados na Ásia, África e América Latina, e a incidência de Leishmanioses no mundo é estimada em 400 mil casos/ano, dos quais, 300 mil reportam-se à Leishmaniose Visceral (WHO 1990; ASHFORD et al. 1992).

Amplamente difundidas nas Américas, as Leishmanioses apresentam quadro clínico variável, nas formas cutânea, mucocutânea ou cutâneo difusa e visceral; que pode evoluir para cura, espontânea em alguns casos de formas cutâneas ou sob ação terapêutica, e ou reduzir a enfermidade, como nos casos graves de Leishmaniose Visceral e nos quadros mutilantes de Leishmaniose mucocutânea ou difusa (BERMAN 1997).

A Leishmaniose Visceral manifesta-se com seu primeiro caso autóctone nas Américas, no Paraguai, descrito em 1913 por Migone (LAINSON e SHAW 1979), entretanto a Leishmaniose Tegumentar guarda reminiscências de um passado remoto pré-colombiano, representado em cerâmicas peruanas por figuras com feições alteradas, apresentando lesões que conferem à doença caráter deformante como o observado em casos de Leishmaniose cutâneomucosa (PESSOA e MARTINS 1977).

Uma sucessão de novos casos da doença vem sendo descrita em diversos locais e com tendência a se intensificar, face as alterações que vêm ocorrendo no mundo pós-moderno, principalmente na América Latina, devido às transformações político-econômicas e à crise financeira que vem enfrentando os países que fazem parte do complexo de Nações em fase de desenvolvimento. Em se tratando de Leishmaniose Visceral, a questão sócio-econômica é fundamental; condições de baixa renda e má nutrição, associadas a migrações de indivíduos de zona rural, juntamente com seus cães infectados, para os bolsões periféricos dos grandes centros urbanos, favorecem, sobremaneira, o alojamento da doença (LACERDA 1994; AGUILAR et al. 1998).

Já, a transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana assume dois padrões epidemiológicos distintos: o clássico, que guarda, ainda hoje, relação estreita com as matas, nos projetos de expansão de atividades agrícolas e garimpo (DOURADO et al. 1989) e o de áreas de colonização antiga, típicas da Região Sudeste e Nordeste do Brasil, que sofreram redução drástica de sua cobertura vegetal e profundas alterações ambientais provocadas pelo homem (GOMES e GALATI 1989; GOMES 1992, 1994; TOLEZANO 1994; BRANDÃO-FILHO et al. 1999).

As infecções leishmanióticas têm como agentes etiológicos, parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, cujas cadeias de transmissão envolvem dípteros da subfamília Phlebotominae e diversos hospedeiros vertebrados, destacando-se dentre eles o homem (LAINSON e SHAW 1987). Tem-se conhecimento de 20 espécies patogênicas de *Leishmania* que são transmitidas pela picada de flebotomíneos, causando doença em seres humanos (ASHFORD 2000).

A circulação de parasitos, na natureza, de um mamífero a outro é assegurada pela atividade alimentar dos flebotomíneos (KILLICK-KENDRICK e WARD 1981). Desse modo, a freqüência com que o flebotomíneo pratica o hematofagismo tem implicações de importância na manutenção da enzootia. Além disso, também devem ser consideradas as densidades do vetor e de animais vertebrados não imunes (SHAW e LAINSON 1972).

Para a inclusão de um animal silvestre como reservatório natural, KILLICK-KENDRICK e WARD, em 1981, consideram os seguintes parâmetros:

- os parasitos isolados de um reservatório suspeito não devem ser distintos dos isolados humanos;
- as infecções na população do reservatório suspeito não devem ser raras;
- o flebotomíneo deve suprir sua alimentação, pronta e freqüentemente no animal suspeito;
- o índice de infecção no animal suspeito seja de proporções tais, que possam permitir a ingestão de parasitos pelo flebotomíneo.

Nas infecções leishmanióticas na forma visceral, ressalta-se a participação de canídeos silvestres da espécie *Cerdocyon thous* e de marsupiais da espécie *Didelphis marsupialis* (DEANE e DEANE 1955; MELLO et al. 1988; CORREDOR et al. 1989a, 1989b; LAINSON et al. 1990; COURTENAY et al. 1996; TOLEZANO et al. 1999).

A existência do ciclo enzoótico mantido em raposas permite a propagação do parasito em áreas livres da infecção, as quais, como reservatórios adicionais silvestres, servem como fonte para possíveis focos da doença em cães domésticos e humanos (COURTENAY et al. 1996). No entanto, em áreas endêmicas, em

peridomicílio, é de considerável importância o papel desempenhado por cães domésticos na transmissão da Leishmaniose Visceral. Desta maneira, admite-se que grande número de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) tornem-se infectadas ao se alimentarem em cães contaminados e possam veicular a infecção para o homem (LAINSON e SHAW 1987; MILES et al. 1999).

De acordo com HERTIG (1957), citado por HERRER (1973, p.585) e FALQUETO (1995, p.1), os achados da infecção natural, com a participação de animais silvestres como reservatório da Leishmaniose Tegumentar nas Américas, datam de 1957, no Panamá, quando do encontro de *Proechimys semispinosus* infectado com uma espécie de *Leishmania* similar àquelas que causavam infecções em humanos.

Desde então, o encontro de animais silvestres com infecção natural tem sido relatado em diferentes áreas neotropicais (FORATTINI 1960; NERY-GUIMARÃES e AZEVEDO 1964; LAINSON e STRANGWAYS-DIXON 1964; HERRER e TELFORD 1969; LAINSON e SHAW 1969; BARBOSA et al.1970; FORATTINI et al. 1972,1973; HERRER et al. 1973; LAINSON et al. 1981).

Tem-se conhecimento do envolvimento de 40 espécies de mamíferos em condições naturais, dentre elas: roedores, desdentados, marsupiais, alguns primatas.e carnívoros (LAINSON e SHAW 1979,1987).

O encontro, em caráter isolado, de formas flageladas em animais silvestres não é suficiente para considerá-los como reservatório; outrossim, seus isolados deverão ser semelhantes aos encontrados em humanos e que além disso, os

flebotomíneos transmissores mantenham atividades hematofágicas contíguas com esses animais, para considerá-los como tal (LAINSON e SHAW 1987).

Com certa frequência, tem sido observada a presença de infecção em animais domésticos, cães e equinos, em áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar (AGUILAR et al. 1984; COUTINHO et al. 1985; FALQUETO et al. 1986,1991; YOSHIDA et al. 1990 BARBOSA et al. 1999) e quando esta ocorre, deve-se, por muitas vezes, à presença do vetor no peridomicílio em alta densidade.

Das 469 espécies de flebotomíneos descritas na Região Neotropical (GALATI 1990, 2002), cerca de 60, têm envolvimento conhecido ou suspeito na transmissão de *Leishmania* em mamíferos (KILLICK-KENDRICK 1990; DEDET 1993; SANTOS et al. 1998; CIPA GROUP 1999; SILVA e GRUNEWALD 1999). Os padrões de transmissão no Continente Americano não são tão bem definidos quanto os do Velho Mundo, dada a diversidade de espécies, sua associação e adaptação a nichos particulares (KILLICK-KENDRICK 1990).

No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é a espécie vetora incriminada na veiculação de Leishmaniose Visceral (DEANE e DEANE 1954; LAINSON et al. 1985) e tem sido frequentemente utilizada para estudos experimentais da infecção e fisiologia (LEWIS e WARD 1987); todavia, evidências epidemiológicas levam a supor que *Lutzomyia forattinii* Galati, Rego, Nunes & Teruya, 1985 e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938), no Estado de Mato Grosso do Sul, exerçam papel de importância na transmissão (GALATI et al. 1997). O encontro da infecção natural nesta última (SANTOS et al. 1998) reforça a sua participação na veiculação dessa parasitose.

Na transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana, para algumas espécies de flebotomíneos, atribui-se o papel comprovado de vetor, e dentre elas destacam-se: *Bichromomyia flaviscutellata* (Mangabeira,1942), *Nyssomyia umbratilis* (Ward & Fraiha,1977) e *Psychodopygus wellcomei* Fraiha, Shaw & Lainson,1971 (KILLICK-KENDRICK 1990). Foram encontradas espontaneamente infectadas, *Bichromomyia olmeca nociva* (Young & Arias,1982) e *Nyssomyia anduzei* (Rozeboom, 1942) (DEDET 1993).

Mais recentemente, foi reportado o isolamento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* dos flebotomíneos *Migonemyia migonei* (França,1920) (AZEVEDO et al. 1990) no Estado do Ceará, *Nyssomyia whitmani* (Antunez & Coutinho,1939) no Município de Baturité, Ceará, e em duas áreas no Estado do Paraná (QUEIROZ et al 1994; LUZ et al. 2000), assim como de *Leishmania (Viannia) sp* nas espécies *Pintomyia (Pifanomyia) misionensis* (Castro,1959) e *Pintomyia (Pintomyia) pessoai* (Coutinho & Barretto,1940) no Estado do Rio Grande do Sul (SILVA e GRUNEWALD, 1999). No entanto, evidências epidemiológicas levam a suspeitar que *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva,1912), *Psychodopygus amazonensis* (Root,1934) e *Psychodopygus paraensis* (Costa Lima,1941), possam estar desempenhando papel relevante na transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana em certas áreas do país (KILLICK-KENDRICK 1990).

Nyssomyia intermedia, considerada como única espécie, passou a ser tratada como um complexo, do qual fazem parte *N. intermedia* s.s. e *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926), esta ressuscitada de sinonímia da primeira (MARCONDES 1996). Ambas provavelmente atuam como vetoras de Leishmaniose Tegumentar em áreas de ambiente modificado.

Nyssomyia intermedia ocorre em regiões úmidas da costa do Nordeste até o Estado de São Paulo e *N. neivai* ocupa região costeira do Paraná ao Rio Grande do Sul e áreas mais para o interior desses Estados (MARCONDES et al. 1998), porém em algumas áreas do Vale do Ribeira, no Estado de São Paulo, ocorrem em simpatria.

Os flebotomíneos são insetos pequenos, variando de 2 a 3 mm, apresentam cor amarelada (cor-de-palha) ou castanho-clara, são conhecidos popularmente como “mosquito palha”, “birigüí”, “cangalhinha” ou “tatuquira”, denominações estas que variam segundo à região geográfica a que pertencem.

O processo evolutivo dá-se por holometabolia, sendo que as formas imaturas criam-se em solo sombreado, úmido e rico em matéria orgânica.

Os exemplares adultos, de acordo com a paisagem regional, podem ser encontrados nos mais diferentes tipos de habitat, tais como: locas de animais silvestres, troncos e ocos de árvores, buracos de pau e fendas, porém, não distantes de seus criadouros naturais.

Sua importância na transmissão das leishmanioses é conferida de acordo com suas atividades hematofágicas, abundância e presença de flagelados em exemplares provenientes de ambiente silvestre (FORATTINI 1973).

O conhecimento do padrão alimentar destes dípteros faz parte de um conjunto de informações que se tornam necessárias para o entendimento das relações hospedeiro-vetor e sua respectiva significância na transmissão da doença. Deve ser considerado como indicador em determinados ambientes, dos possíveis animais que estejam participando na manutenção do ciclo enzoótico, além de sua importância como reservatório.

LAINSON e SHAW, em 1979, ao ressaltarem a validade da identificação de hábito alimentar em flebotomíneos; salientam a necessidade dos exemplares coletados pertencerem a diferentes localidades e os estudos dirigidos durante longos períodos para se determinar os prováveis reservatórios de *Leishmania*.

Acresce-se a isso, que os locais de captura, a sazonalidade e a variabilidade de hospedeiros são fatores que influenciam uma dada espécie de flebotomíneo, a diversificar o seu comportamento alimentar (TESH et al. 1972; SOUZA et al. 1981; MONTOYA-LERMA e LANE 1996).

Diversas metodologias têm sido empregadas na pesquisa do hábito alimentar de flebotomíneos e dentre elas, destacam-se observações visuais, capturas com isca humana, armadilhas contendo iscas animais, encontro em abrigos de animais silvestres e domésticos e técnicas sorológicas.

Entretanto, a maioria dos estudos que objetivam a investigação de seu comportamento alimentar, tem como enfoque a utilização de iscas animais (SHERLOCK e GUITTON 1969; CHRISTENSEN e HERRER 1973,1980; ARIAS e FREITAS 1977; AGUIAR et al. 1986,1987; RANGEL et al. 1986,1990; GOMES e GALATI 1989; QUINNELL e DYE 1994; FALQUETO 1995; CAMPBELL-LENDRUM et al. 1999; TANIGUCHI 2000).

As técnicas imunológicas para detecção de sangue ingerido em artrópodes têm sido utilizadas desde os primórdios de 1900, quando KING e BULL, 1923 e RICE e BARBER,1935 adaptaram a técnica de precipitina para determinar a fonte alimentar em mosquitos e outros insetos, cujo fundamento se baseia na reação de precipitação que ocorre no contato entre o sangue ingerido pelo inseto e o antisoro total produzido em animal de laboratório (EDRISSIAN e HAFIZI 1982).

WEITZ, na década de 60, elaborou uma primeira revisão da aplicação metodológica de técnicas sorológicas e TEMPELIS, 1975, entre outros, discute a viabilidade dos avanços no emprego das técnicas de inibição passiva de hemoaglutinação (WEITZ 1956), imunofluorescência (GENTRY et al. 1967), cristalização de hemoglobina (WASHINO e ELSE 1972) e precipitina, considerando que puderam ser observadas mudanças de comportamento alimentar, devido a fatores tais como: ação do homem no meio ambiente e diversidade das espécies, assim como viabilidade da fonte de alimento.

Em revisão posterior, WASHINO e TEMPELIS, em 1983, avaliaram modificações na técnica de precipitina: “teste do anel” (WEITZ,1960), “teste em tubo capilar” (TEMPELIS e LOFY,1963), “teste em microplaca” (TESH et al. 1971), incluindo apreciações a respeito dos métodos de inibição passiva de hemoaglutinação, imunofluorescência e técnica imunoenzimática (ELISA).

Na Região Neotropical, a técnica de precipitina e demais variações, passaram a ser utilizadas em flebotomíneos (TESH et al. 1971,1972), quando do isolamento do vírus da estomatite vesicular no Panamá, e ainda hoje, são empregadas na identificação da fonte alimentar destes insetos (CHRISTENSEN et al. 1982a, 1982b; MORRISON et al. 1993; AÑEZ et al. 1994; OGUSUKU et al. 1994).

Por outro lado, resultados obtidos ao longo das primeiras décadas, induziram alguns pesquisadores a investigar metodologias que apresentassem maior sensibilidade e especificidade.

A técnica imunoenzimática (ELISA), inicialmente utilizada no diagnóstico de pacientes amarelicos (VOLLER et al. 1974), foi posteriormente adaptada para o estudo do hábito alimentar em culicídeos (BURKOT et al.1981; EDRISSIAN e

HAFISI 1982), tornando-se uma alternativa viável, para a identificação de sangue ingerido.

Em comunicação posterior, PANT et al. 1987 publicaram artigo com base no relatório da Organização Mundial da Saúde, o qual abordava o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, para a identificação do sangue ingerido por vetores e comentam modificações na metodologia, destacando as vantagens no emprego da técnica de ELISA de imunocaptura, assim como, do “ELISA – dot blot” realizado em membranas de nitrocelulose.

Dessa maneira, diversas modalidades da técnica de ELISA têm sido desenvolvidas para o estudo do hábito alimentar, dependendo particularmente, da concentração de sangue ingerido, contido nas amostras e das informações que se deseja obter no estudo (BLACKWELL et al. 1995).

BURKOT et al. 1981 e TESH et al. 1988 adaptaram a técnica empregada por VOLLER et al. 1974, utilizando antisoro conjugado à peroxidase ou à fosfatase alcalina, para estudos de hábito alimentar de *Aedes triseriatus* (Say), *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) e *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786).

EDRISSIAN et al. 1985 e BEIER et al. 1988 adotaram o método ELISA direto para identificar exemplares de *Anopheles* sp, cujo repasto foi efetuado em seres humanos e animais domésticos, sendo que EDRISSIAN et al. 1985 fizeram uso de IgG conjugada à fosfatase alcalina e BEIER et al. 1988 empregaram IgG conjugada à peroxidase. Recentemente, SAVAGE et al. 1993; NIEBYLSKI et al. 1994 e RUBIO-PALIS et al. 1994 utilizaram a mesma técnica de ELISA, adaptada com base no estudo realizado por BEIER et al. 1988, para a caracterização de sangue ingerido por *Aedes albopictus*.

Com o estabelecimento da técnica ELISA de imunocaptura, foi possível detectar nas amostras eluidas de diferentes espécies de vetores, a presença de sangue ingerido em pequenas concentrações, tais como, as encontradas em pequenos dípteros das famílias Ceratopogonidae e Psychodidae que ingerem, em média, 0,01 a 0,1 e 0,01 a 0,3 miligramas de sangue, respectivamente, bem como evidenciar mais de um repasto efetuado em diferentes fontes alimentares (SERVICE et al. 1986).

BLACKWELL et al. 1994, 1995, estudando o hábito alimentar de *Culicoides* sp, optaram pelo emprego da técnica ELISA de imunocaptura, utilizando anti IgG da espécie hospedeira para identificar sangue ingerido.

A partir da década de 1990, diversos autores empregaram a técnica imunoenzimática nos estudos de hábito alimentar de flebotomíneos.

Utilizando o método ELISA direto, segundo o modelo estabelecido por BEIER et al. 1988 e o de EDRISSIAN et al. 1985, respectivamente, NGUMBI et al. 1992 e YAGHOUBI-ERSHADI et al. 1995 estudaram o hábito alimentar de exemplares de *Phlebotomus martini* Parrot, 1936 e *Phlebotomus papatasi* do Distrito de Baringo no Kenya e da Província de Isfahan no Irã.

Dada a necessidade de se identificar vertebrados com potencial na transmissão do vírus da estomatite vesicular, COMER et al. 1994 empregaram a técnica ELISA modificada por IRBY e APPERSON, 1988, para a determinação de sangue ingerido por fêmeas da espécie *Psathyromyia shannoni* (Dyar, 1929).

QUINNEL et al. 1992, em estudos realizados no Estado do Pará, empregaram o teste ELISA de imunocaptura (SERVICE et al. 1986), para identificar o sangue ingerido em fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em hospedeiros conhecidos, com o objetivo de verificar experimentalmente a preferência alimentar.

COLMENARES et al. 1995, também utilizando o ELISA de imunocaptura, empregando o sistema peroxidase avidina-biotina, estudaram o comportamento alimentar de *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911, em quatro diferentes áreas geográficas na Espanha .

Dada a problemática em se detectar proteínas em pequenas quantidades de sangue ingerido e considerando que a técnica ELISA de imunocaptura vem sendo empregada na investigação de hábito alimentar de flebotomíneos em diversas localidades, com obtenção de resultados satisfatórios, suscita a introdução do método de ELISA de imunocaptura utilizando o sistema fosfatase alcalina avidina-biotina como complemento de informações nos estudos de hábito alimentar de vetores objetivando identificar possíveis hospedeiros das leishmanioses.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, para a identificação de repastos sangüíneos em flebotomíneos, valendo-se da sensibilidade e especificidade do método avidina-biotina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Padronizar a técnica de ELISA de imunocaptura em *Lutzomyia longipalpis* criados em laboratório e alimentados sobre rato.

* Determinar a cinética deste sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis*, após períodos de 12, 24, 48 e 72 horas.

3. MÉTODO

3.1 Amostras

Para a padronização da técnica, foram utilizados sessenta exemplares de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*, procedentes de colônia do Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, criados no Laboratório de Entomologia do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). As larvas foram mantidas em placas com fundo de gesso e receberam alimentação adequada ao ambiente laboratorial, constituída por macerado contendo fezes desidratadas de coelho, terra e alimento utilizado para peixes, até a fase de pupa. Após os adultos emergirem, foram separados trinta machos e trinta fêmeas, sendo estas, alimentadas em rato procedente de biotério do Instituto Adolfo Lutz e os machos em solução de H₂O e açúcar. Os exemplares adultos foram mantidos durante todo o experimento em temperatura ambiente de 25°C ± 2°C.

Das fêmeas, foram retiradas a cabeça e genitália para identificação da espécie (tal como se procederá com os exemplares procedentes de coletas de campo). O tórax e abdome foram acondicionados em microtubos e conservados em freezer à - 20°C, até o momento de uso. O método empregado foi o ELISA de captura modificado (CONSALES 1999).

3.1.1 Preparo das amostras

O tórax e abdome dos exemplares foram eluídos e macerados em 200 µl de solução PBS-BSA 0,1% e a seguir centrifugados a 12.000 rpm, por 5 minutos e os sobrenadantes acondicionados à -20 °C.

Para o controle positivo do teste, foram coletados 10 µl do eluato de cada uma das trinta amostras de fêmeas ingurgitadas e a seguir acondicionados em freezer à -20°C.

Para o controle negativo do teste, foram coletados 10 µl de eluato de cada uma das trinta amostras de machos e acondicionados da mesma maneira que o controle positivo.

3.1.2 Material utilizado para padronização do teste de ELISA de captura

- 1- Microplacas de 96 cavidades (Nunc®, 442404, Maxisorp, Denmark)
- 2- PBS
Na₂ HPO₄ 7,6g
NaCl 4,8g
KH₂PO₄ 1,45g
qsp 1000ml H₂O bidestilada
pH 7.4;
- 3- Soro total anti-rato desenvolvido em coelho, delipidizado.
Produto No.R-5256 – lote 081H48021- SIGMA-
Concentração de proteína= 58,3 mg/ml;

- 4- IgG anti-rato produzido em cabra, conjugado à biotina.
Produto No. B7139 – lote 100K9167 – SIGMA –
Proteína total= 0,5mg/ml;
- 5- Avidina Fosfatase Alcalina-5.
Produto No. A7294- lote 21K4817- SIGMA;
- 6- Albumina Bovina (BSA) A7030- lote 81K1777- SIGMA;
- 7- Tabletes p-Nitrophenyl phosphatase,disodium (PNPP): SIGMA # 104-105-
lote 118H6128;
- 8- Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20) P-1379 lote 33HO250;
- 9- Tampão de ELISA
PBS pH 7.4
0,1% BSA;
- 10- Tampão de Bloqueio
PBS pH 7.4
1% BSA;
- 11- Tampão Dietanolamina
10% Dietanolamina Merck
0,5 mmol/litro MgCl₂ Merck
pH 9.8;

12- Tampão de Lavagem

Concentração 50 vezes

0,5M Na₂HPO₄

0,5M KH₂PO₄

pH 7.2

Concentração 1vez

100 ml da solução 50 vezes

2,5ml Tween 20

qsp 5.000ml de H₂O bidestilada

3.2 Padronização do teste

Microplacas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 50 µl/cavidade de soro total anti-rato (R-5256, Sigma, USA) em duplicata, nas concentrações de 20 µg/ml a 0,625 µg/ml diluída em PBS e incubadas à 4°C por 18 horas. Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20, por cinco vezes e os sítios livres, bloqueados com 200 µl/cavidade de PBS-BSA 1%, por 3 horas à temperatura ambiente.

Após este período, e a cada etapa da reação, foram realizadas lavagens, como mencionado acima, sendo a seguir adicionados 50 µl/cavidade do eluato das trinta fêmeas ingurgitadas em duplicata nas diluições de 1:50 a 1:3200 e as microplacas incubadas à 4°C por 18 horas.

A seguir, foi acrescentado 50 µl/cavidade de IgG anti-rato biotilado (B7139, Sigma, USA) nas concentrações de 8µg/ml a 2µg/ml e as microplacas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação e lavagem, foram adicionados 50 µl/cavidade de avidina-fosfatase alcalina, nas diluições que variaram de 1:10.000, 1:30.000 e 1:40.000, permanecendo por mais uma hora à temperatura ambiente.

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

Após a padronização da técnica, as trinta amostras foram processadas separadamente e em duplicata, para o estabelecimento da quantificação do sangue ingerido por flebotomíneos, sendo adicionados em cada microplaca controles positivo e negativo, a fim de se evitar variações nos valores de absorbância, que poderiam interferir na significância do teste, quando as microplacas não são lidas logo após a adição do substrato (RUBIO-PALIS et al 1994).

Para o cálculo das trinta amostras de *Lutzomyia longipalpis*, foram computados todos os valores de absorbância e os títulos de sangue ingerido foram expressos como \log_2 da recíproca da maior diluição das amostras apresentando reação positiva.

3.3 Cinética de ingestão de sangue por *Lutzomyia longipalpis*.

Para o estudo da cinética de hábito alimentar, foram separadas outras sessenta fêmeas ingurgitadas, processadas separadamente e subdivididas em quatro grupos de 15 exemplares cada, sendo estabelecidos quatro diferentes horários para a quantificação de sangue ingerido.

Os exemplares dos quatro grupos foram mantidos em insetário à temperatura ambiente e sacrificados em períodos de aproximadamente 12, 24, 48 e 72 horas pós-ingestão, sendo então, processada a técnica de ELISA de imunocaptura com a adição a cada microplaca das amostras a serem testadas em duplicata e os respectivos controles positivo e negativo, conforme item 3.2.

3.4 Análise Estatística

Foram determinadas as médias em \log_2 , desvios padrão e variâncias para o cálculo do índice de positividade das amostras empregadas na reação e para a quantificação de sangue ingerido nos horários pré-estabelecidos pós-ingestão e os resultados foram analisados pelo teste t de student, a nível de significância 1% ($p < 0,001$).

4 RESULTADOS

Para a identificação da concentração ideal do anti-soro de rato, para a sensibilização da microplaca, foi realizada uma titulação em bloco, variando-se as concentrações do anti-soro frente a diferentes diluições das amostras que compõem o controle positivo, em duplicata. A menor concentração do anti-soro a ser utilizada na reação foi determinada como sendo $0,625\mu\text{g/ml}$ (Figuras 1 e 2).

A seguir, foi determinada a menor concentração do segundo anticorpo, sendo estabelecido $8\mu\text{g/ml}$ (Figura 3) e também foram testadas diferentes diluições de avidina-fosfatase alcalina, sendo a diluição de 1:40.000 considerada como a que mais se adequou à reação (Figura 4).

Das diferentes diluições das amostras testadas na razão 2, a menor diluição para exemplares de flebotomíneos contendo em torno de dois a quatro quartos de sangue no conteúdo abdominal, foi de 1:256.

O ponto de corte da reação foi estipulado pelo emprego de três vezes o desvio padrão das amostras, sendo a absorbância específica igual ou maior que 0,261 considerada como valor positivo. A média dos brancos foi 0,082 com desvio padrão de 0,0065.

A média dos títulos de sangue ingerido para as trinta amostras foi $13,12 \log_2$ com desvio padrão de 0,084 e as médias determinadas para os grupos controle positivo e negativo das amostras testadas foram $12,2 \log_2$ e $1 \log_2$, respectivamente. Os resultados referentes às trinta amostras utilizadas no estabelecimento da técnica para a quantificação de sangue ingerido encontram-se representados na Figura 5.

No estudo da cinética do hábito alimentar, os resultados obtidos estão expressos pelas médias, desvios padrão e variâncias e encontram-se expostos nas Tabela 1 e o

resultado da dispersão das 15 amostras de 12 horas e 24 horas pós-ingestão encontram-se representados nas Figuras 6 e 7.

Para os grupos com períodos de 12 e 24 horas pós-ingestão, verificou-se diferença significativa entre os títulos ($t= 65$; $p< 0,001$). Porém, para as amostras de 48 horas pós-ingestão as médias dos títulos foram inferiores a $5 \log_2$ e para as amostras com 78 horas pós-ingestão a média dos títulos foi inferior a $1 \log_2$, resultado este semelhante ao obtido no controle negativo, o que leva a deduzir a ausência de sangue no tubo digestivo.

Diluições de eluato de 30 fêmeas ingurgitadas de *L. longipalpis*

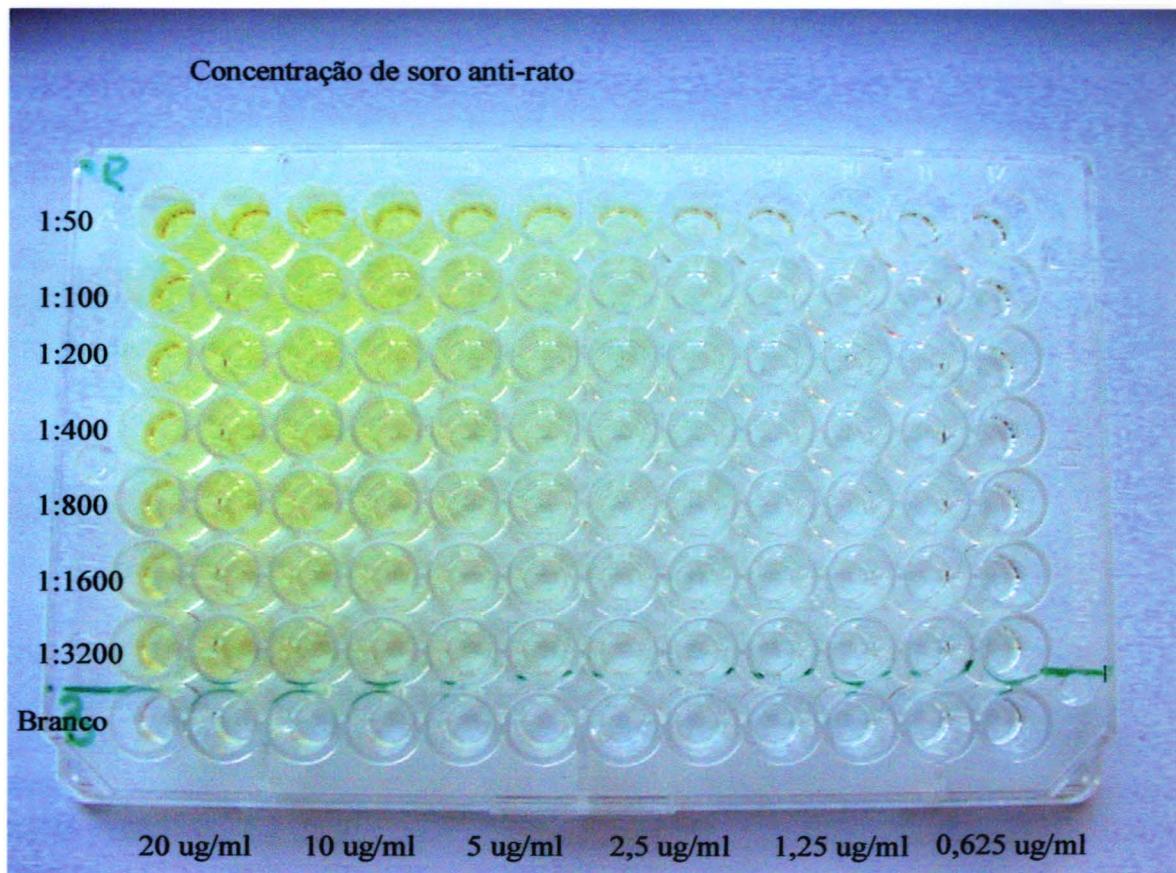


Figura 1- Quantificação de soro anti-rato para padronização do teste de ELISA de imunocaptura.

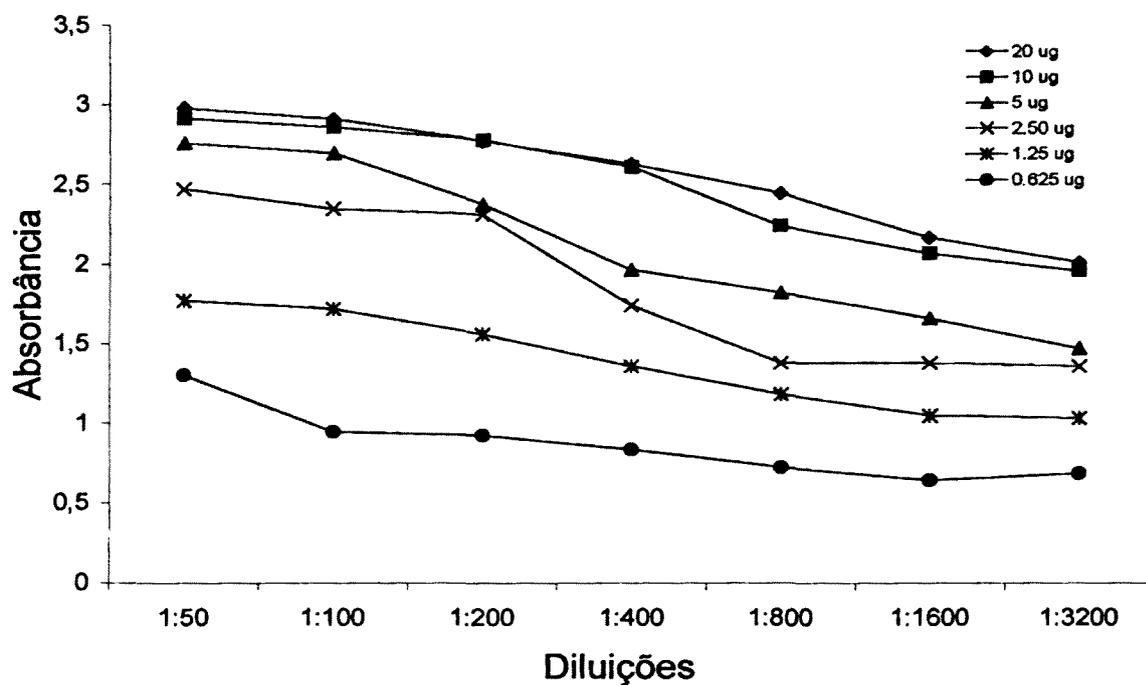


Figura 2 - Determinação da concentração adequada do anti-soro de rato para o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura destinado à quantificação de amostras de sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis*.

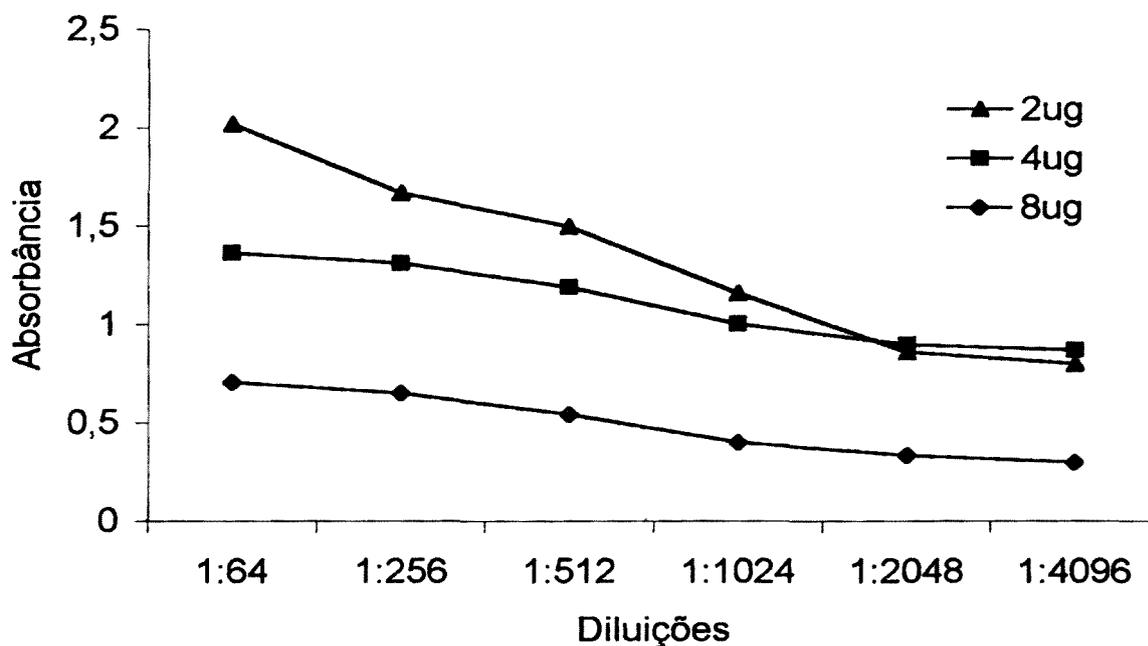


Figura 3 - Determinação da menor concentração do 2º anticorpo frente a diferentes diluições do eluato das 30 amostras.

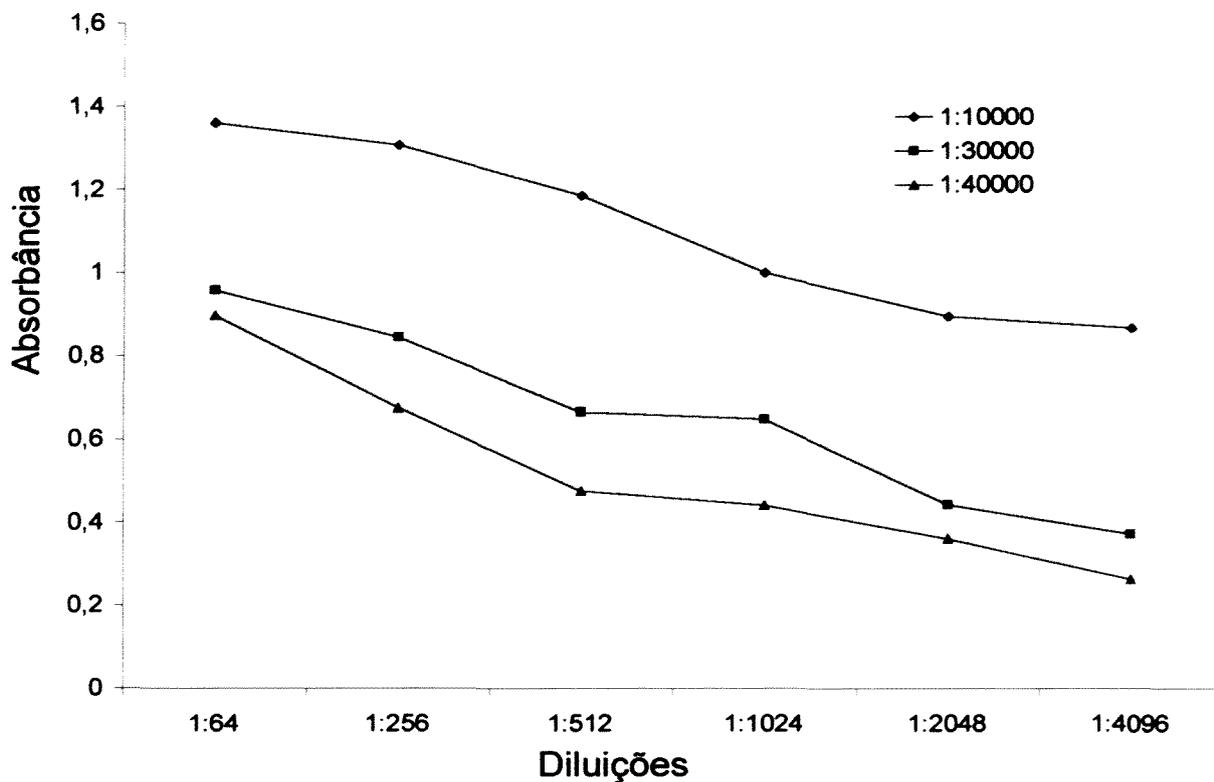


Figura 4 - Determinação da diluição adequada de avidina-fosfatase alcalina para o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura.

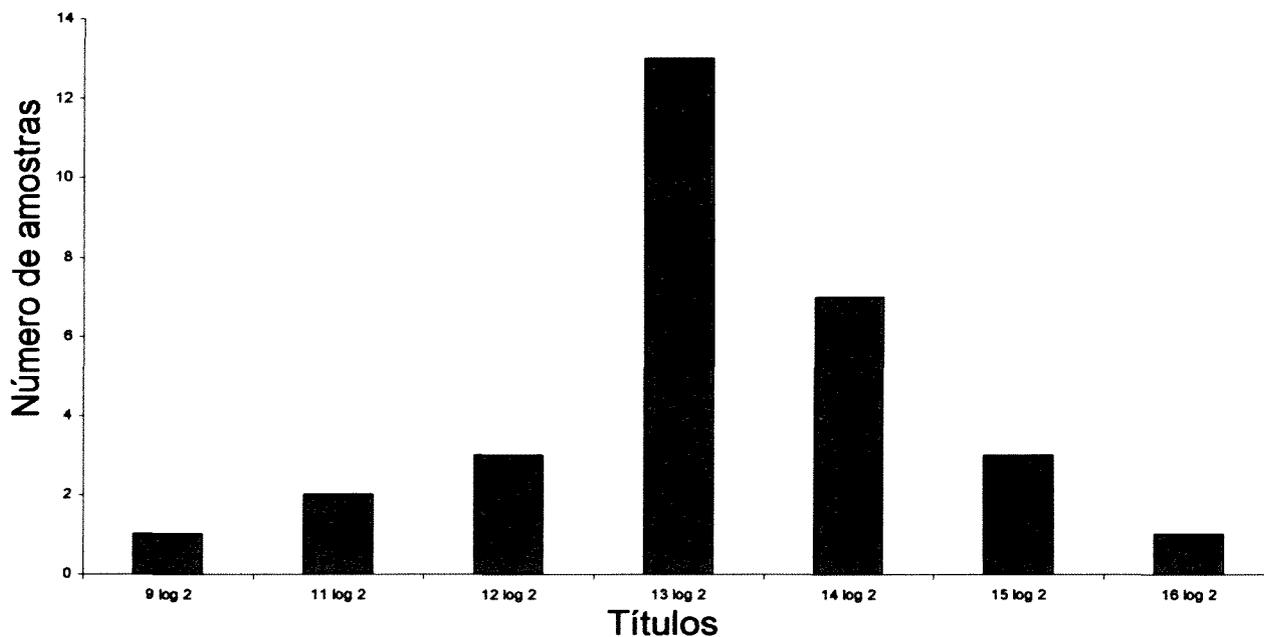


Figura 5 - Distribuição dos títulos de sangue ingerido em 30 exemplares de *Lutzomyia longipalpis* alimentadas em rato

Tabela 1- Média dos títulos de sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis* em rato segundo horas pós ingestão.

nº de amostras	horas pós-ingestão	\bar{x} log 2	S	V
15	12 h	11,3	0,09	0,0081
15	24 h	10	0,16	0,0256
15	48 h	<5	nd	nd
15	72 h	<1	nd	nd

nd: não determinado

S: desvio padrão

V: variância

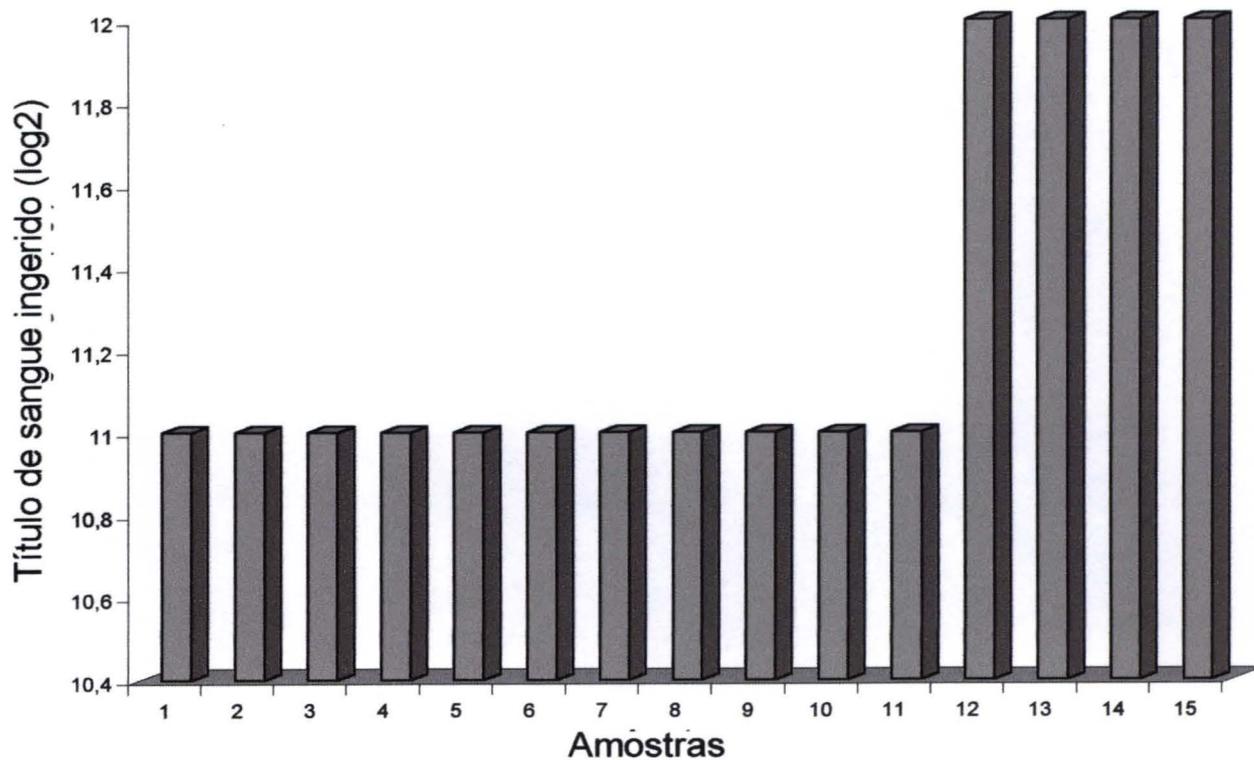


Figura 6- Quantificação de sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis* 12 horas pós-ingestão determinada experimentalmente em rato

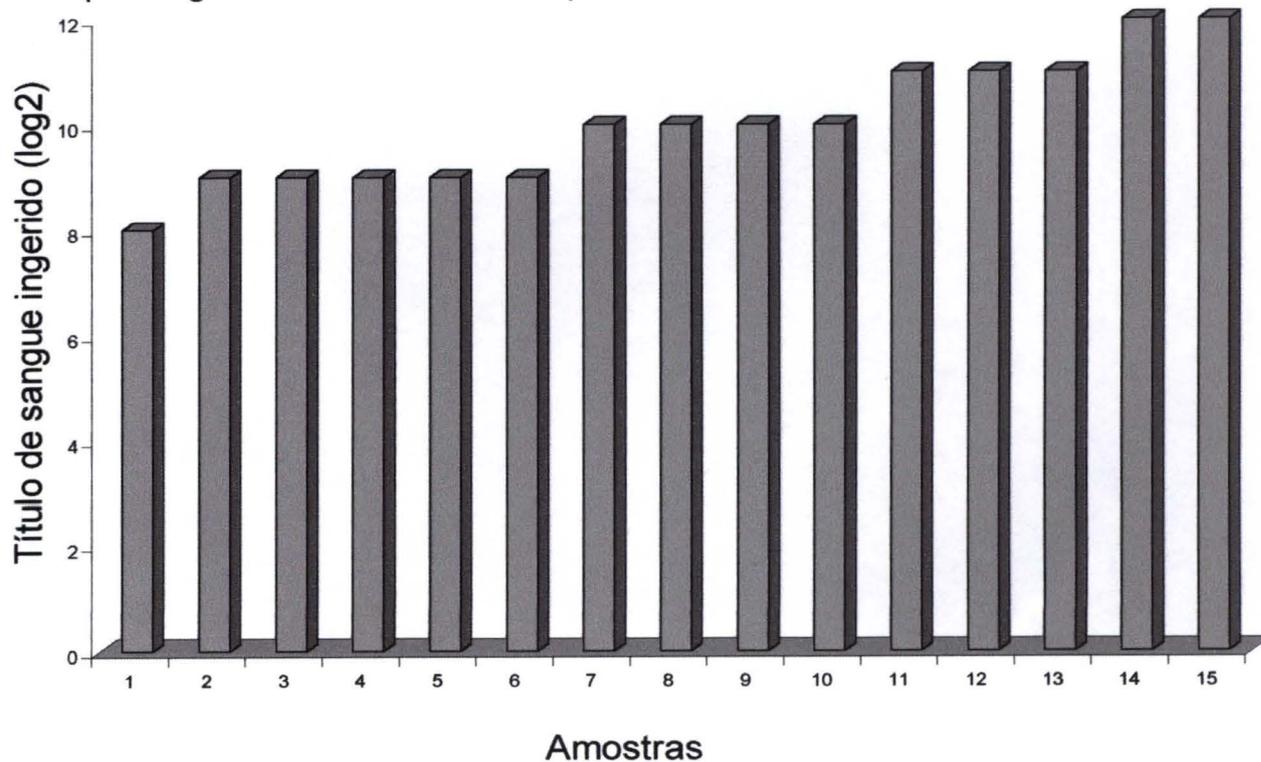


Figura 7 - Quantificação de sangue ingerido por *Lutzomyia longipalpis* 24 horas pós-ingestão determinada experimentalmente em rato

5 DISCUSSÃO

A atração de fêmeas de flebotomíneos em relação ao homem e 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.

Embora o repasto sanguíneo para muitas espécies de flebotomíneos na Região Neotropical ocorra na população humana e de animais domésticos, torna-se de interesse conhecer com que frequência esta atividade se desenvolve sobre o homem, em diferentes ecossistemas, para que se possa atribuir-lhes o papel de possíveis vetoras de *Leishmania*. Claro que, sendo os animais os hospedeiros essenciais das leishmânias, a multiplicidade de hospedeiros com que o flebotomíneo se envolve, representa uma importante contribuição na epidemiologia das leishmanioses.

Com este enfoque, estudos valendo-se de iscas animais, têm fornecido dados essenciais, na resposta a questões das possíveis associações entre animais reservatórios e insetos transmissores, nos diferentes habitats (SHERLOCK e GUITTON 1969; CHRISTENSEN e HERRER 1973,1980; ARIAS e FREITAS 1977; AGUIAR et al. 1986,1987; RANGEL et al. 1986,1990; GOMES e GALATI 1989; QUINNELL e DYE 1994; FALQUETO 1995; CAMPBELL-LENDRUM 1999; TANIGUCHI 2000). O mesmo não se pode afirmar em relação aos estudos de caráter experimental, como justificativa de identificação de preferência alimentar, visto que a fonte ao permanecer em contato com o vetor, induziria os repastos, que, não necessariamente, seriam da forma como ocorrem na natureza (GUY et al. 1984).

Portanto, o emprego de técnicas imunológicas no estudo do hábito alimentar associado ao hematofagismo de insetos, pode acrescentar novos conhecimentos ao quadro epidemiológico de parasitoses, com a identificação de possíveis hospedeiros nos quais os agentes circulam.

Diferentes técnicas, mais tradicionalmente a de precipitina têm sido empregadas para a identificação de repastos sangüíneos de mosquitos e outros artrópodes hematófagos (EDRISSIAN et al. 1985) e têm revelado apenas o grupo de níveis hierárquicos elevados, tais como, ordens e classes de hospedeiros envolvidos no hematofagismo (SAVAGE et al. 1983).

O teste de precipitina é de utilização limitada para flebotomíneos, pois apenas cinco ou seis testes podem ser utilizados com sucesso, devido à pequena quantidade de sangue ingerido (SERVICE et al. 1986). Embora sua execução seja relativamente simples, apresenta menor sensibilidade e especificidade e alto consumo de anti-soro.

Outros testes como os ensaios envolvendo inibição passiva de hemoaglutinação são mais sensíveis e específicos, contudo, são de difícil adaptação na rotina laboratorial. Já, o método de aglutinação do látex tem sido uma alternativa viável, pelo baixo custo e melhor desempenho, no entanto, apresenta a desvantagem de não distinguir hospedeiros próximos e, sua sensibilidade é inferior à do teste de precipitina.

A técnica de imunofluorescência requer equipamento sofisticado, dispendioso, além de pessoal especializado e o teste de fixação de complemento, quando aplicado na identificação de sangue ingerido por mosquitos, mostrou-se menos sensível do que o teste de hemoaglutinação.

Por outro lado, já há algum tempo, a técnica imunoenzimática (ELISA) vem sendo empregada para a identificação de hábito alimentar de mosquitos (BURKOT et al. 1981) alimentados em diversos animais, conferindo a identificação de fonte sangüínea a nível de gênero. Esta técnica tem se mostrado eficiente, por apresentar maior sensibilidade e especificidade, bem como a sua automação permitir o processamento e investigação de um grande número de amostras, o que representa um aspecto de importância numa investigação epidemiológica.

O ELISA direto, inicialmente empregado por EDRISSIAN e HAFISI, 1982; EDRISSIAN et al. 1985 e BEIER et al. 1988, para identificação de hábito alimentar em culicídeos e posteriormente em estudos realizados por NGUMBI et al. 1992; SAVAGE et al. 1993; NIELBYSKI et al. 1994; RUBIO-PALIS et al. 1994 e YAGHOABI-ESHARDI et al. 1995, para culicídeos e flebotomíneos, demonstraram a possibilidade de detecção de IgG específica de hospedeiros.

A sensibilidade e especificidade pode ser aumentada com a introdução da técnica ELISA de imunocaptura. SERVICE et al. 1986, aplicaram esta técnica para a identificação de sangue ingerido por culicídeos e culicídeos e ressaltaram as vantagens de seu uso como proposição alternativa ao teste de precipitina, em vista da possibilidade de reconhecer a fonte sangüínea em amostras contendo quantidades reduzidas de sangue recém-ingrido.

Neste estudo, a opção do emprego do teste imunoenzimático de captura fazendo uso do sistema fosfatase alcalina avidina-biotina justifica-se efetivamente por:

- sua sensibilidade e especificidade, pois cada molécula de avidina apresenta quatro sítios de ligação com a biotina; esta, sendo uma vitamina que pode ser conjugada facilmente a moléculas de alto ou baixo peso molecular, sem

que ocorra perda de sua atividade biológica e que, por sua vez, apresenta elevada interação com a avidina (GUESDON et al. 1979; HUNTER et al. 1991).

- somente o sistema peroxidase avidina-biotina ter sido empregado na identificação de repasto sangüíneo de flebotomíneos (COLMENARES et al. 1995).
- permitir a identificação de sangue ingerido em amostras com diferentes períodos de pós-ingestão.
- utilizar a enzima fosfatase alcalina, por ser mais estável em condições de armazenagem e em circunstâncias onde condições estéreis não possam ser mantidas (YOLKEN 1982) e também, por permitir uma grande diluição do produto (PORSTMANN e KIESSING 1992).

Nesse estudo, em relação aos trinta exemplares que apresentaram em torno de 2/4 a 4/4 de sangue no conteúdo abdominal, cujos eluatos foram diluídos 1:256, o teste provê a execução de aproximadamente noventa provas em duplicata, assim justificando-se o emprego da técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, por poder demonstrar que com mínimas concentrações de soro total anti-rato (0,625 µg/ml), IgG conjugado à biotina (8 µg/ml) e com a diluição de avidina (1:40.000), viabiliza-se grande número de testes, que numa pesquisa de campo é de extrema importância, quando se tem uma grande quantidade de amostras para identificar sangue ingerido e não se dispõe de muitos recursos financeiros para aplicação.

BEIER et al. 1988, avaliaram a sensibilidade do método ELISA direto, em dois diferentes grupos de amostras de *Anopheles stephensi* Liston, com repasto efetuado em humanos e sacrificadas após duas horas, mantidas em dessecador a

temperatura ambiente e conservadas em freezer à -20°C . As amostras testadas foram avaliadas a partir da diluição de 1:50 a 1:25.600 e o ensaio detectou sangue ingerido até a diluição de 1:3.200 para amostras congeladas e 1:12.800 para os exemplares mantidos em dessecador a temperatura ambiente.

Com o mesmo objetivo, SERVICE et al. 1986, utilizaram para a técnica ELISA de imunocaptura, exclusivamente amostras preservadas em papel de filtro contendo sangue humano e verificaram a positividade da técnica empregada para os eluatos a partir de diluições de 1:2 até 1:128.

Ainda considerando as trinta amostras utilizadas neste estudo, cujo conteúdo abdominal compreendia em torno de 2/4 a 4/4 de sangue, a diluição inicial foi estabelecida em $5\log_2$ (1:256) e a reatividade pôde ser constatada a olho nú. Conforme se observa na Figura 5, a diluição de 1:8.192 que corresponde ao título de $13\log_2$ foi a mais freqüente na amostra sob estudo, mas foram encontrados exemplares com diluições até 1:16 384, 1:32 768, 1:65 536 que correspondem aos títulos de $14\log_2$, $15\log_2$ e $16\log_2$ o que suscita a alta sensibilidade do teste ELISA de imunocaptura empregado.

Devido a diferenças nas metodologias empregadas por BEIER et al. 1988 e SERVICE et al. 1986, torna-se difícil a comparação dos resultados com os encontrados nesse estudo, mas ressalta-se a importância em se avaliar as amostras, de acordo com a distensão abdominal, e tem-se como princípio que as diluições iniciais serão diferentes para exemplares com maior ou menor volume de sangue ingerido e horas pós-ingestão.

Nas investigações realizadas por SERVICE et al. 1986 e BLACKWELL et al. 1995, o teste imunoenzimático ELISA de captura viabilizou o reconhecimento de

seis e nove fontes alimentares, respectivamente, em amostras coletadas no campo, tendo o primeiro autor encontrado taxa de 53,8% de positividade para a identificação de hábito alimentar. Deve-se levar em consideração, o fato de que, na natureza, nem todas as fêmeas encontram-se totalmente ingurgitadas, ou contendo sangue recém-ingirido, o que eventualmente poderá interferir na identificação de hábito alimentar.

BURKOT et al. 1981 e BEIER et al. 1988 salientam que os repastos efetuados em poucas horas fornecem os melhores resultados para a análise, porque o processo digestivo também altera a integridade das proteínas.

Com base em nossa vivência, na grande maioria das vezes, observa-se em flebotomíneos capturados na natureza, aproximadamente dois a quatro quartos de sangue recém-ingiridos no conteúdo abdominal, quantidade esta semelhante a utilizada neste experimento. Assim, o teste padronizado neste estudo poderá ser empregado com sucesso na identificação de fonte alimentar.

Para a identificação de hospedeiros domésticos, para os insetos hematófagos, há anti-soros e imunoglobulinas específicas disponíveis comercialmente, porém nem sempre ocorre o mesmo para animais silvestres. Todavia, é possível a produção de anti-soro específico em animais de laboratório e imunoglobulinas específicas através de concentração e purificação, técnica esta empregada no estudo de BLACKWELL et al. 1994, para a identificação de sangue ingerido por *Culcoides* sp em cervos.

Considerando o período pós-ingestão, ao estudar o comportamento da espécie *Aedes triseriatus* alimentada em humanos com intervalos de quatro horas, BURKOT *op. cit.*, por meio da técnica adaptada do estudo de VOLLER et al. 1974, obtiveram quando da utilização de anti-soro para o estudo de amostras congeladas à -20°C,

100% de positividade até oito horas, 75% até doze horas e 40% dezesseis horas pós-ingestão, porém, decorridas vinte horas, a fonte alimentar não foi detectada.

EDRISSIAN et al. 1982, empregando o método ELISA direto, para amostras de sangue ingerido por *Anopheles stephensi* em humanos e cobaias, colhidas em papel de filtro e com períodos pós- ingestão de: 1, 6, 12, 24 e 48 horas, verificaram positividade do teste até 24 horas.

SERVICE et al. 1986, ao utilizar a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, obtiveram 100% de positividade para o teste até 26 horas, em fêmeas ingurgitadas de *Aedes aegypti* alimentadas em humano e mantidas a 24°C e 75% de positividade para as amostras com 31 horas pós-ingestão.

Além de compararem a sensibilidade do ELISA direto, BEIER et al. 1988, também avaliaram para *Anopheles stephensi* períodos pós-ingestão para exemplares acondicionados em dessecador à temperatura de $27 \pm 2^\circ \text{C}$ e para amostras congeladas à -20°C e puderam verificar diferenças no tempo de detecção de sangue. Para as amostras preservadas em dessecador, o teste proporcionou a identificação até 32 horas pós-ingestão, enquanto que, para as conservadas em freezer foi possível conferir a positividade até 23 horas.

Em investigações mais recentes, realizadas ainda com culicídeos, SAVAGE et al. 1993, empregando o método ELISA direto, obtiveram para *Aedes albopictus* mantidos a 27°C e mortos por congelamento a intervalos de 6 horas após alimentação, 100% de positividade para o teste, em amostras contendo sangue humano e de coelho até 24 horas pós-ingestão. Após 30 horas, o total de positividade foi determinada apenas para humano e 60% para as amostras cujos repastos foram

efetuados em coelho, contudo ao longo de 36 horas, obtiveram 40% de positividade para humano, tendo sido mantida a porcentagem de 60% para coelho.

CHOW et al. 1993 compararam a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura com o método direto, para o estudo da cinética de hábito alimentar de *Aedes aegypti* utilizando peroxidase. Na técnica ELISA de imunocaptura obtiveram 100% de positividade para as amostras com 32 horas pós-ingestão e 80% para as amostras com 42 horas e no método ELISA direto obtiveram 100% de positividade para as amostras com 20 horas pós-ingestão.

Ao estudar amostras de *Anopheles muneztovari* Gabaldón 1940, alimentadas em humano e colhidas a intervalos de 4 horas, RUBIO-PALIS et al. 1994, empregando o método ELISA direto, também avaliaram a variabilidade frente ao emprego de dois substratos para peroxidase: ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate (6)]) e TMB (tetramethylbenzidine). Com o substrato ABTS, todas as amostras foram positivas para 24 horas pós-ingestão e quando utilizado o substrato TMB todas foram positivas nas 40 horas e 75% nas 44 horas pós-ingestão.

Recentemente, GOMES et al. 2001 compararam o método ELISA direto com a técnica de precipitina para o estudo da cinética de detecção de sangue ingerido por *Aedes aegypti* e *Aedes fluviatilis* (Lutz) alimentados experimentalmente em humanos, canídeos e felinos e verificaram que o método de ELISA demonstrou maior sensibilidade.

Na avaliação preliminar, estabelecida para *Culicoides sp*, BLACKWELL et al. 1994 utilizando a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura, inferiram a positividade para exemplares com período inferior a 24 horas pós-ingestão.

Embora diferentes técnicas tenham sido empregadas para o estudo do hábito alimentar, as reagentes apontam para um curto período de tempo, aproximadamente 24 horas pós-ingestão.

Para o teste desenvolvido neste estudo, a identificação de sangue ingerido foi viável para todos os exemplares de *Lutzomyia longipalpis* com até 12 e 24 horas pós-ingestão, havendo a possibilidade de detecção até 48 horas, se inicialmente tivesse sido utilizada a diluição $1 \log_2$ (1:2). Tendo em vista a não disponibilidade momentânea de material para o estudo, os resultados deverão ser considerados neste experimento como positivos para todas as amostras efetuadas até 24 horas pós-ingestão.

Deve-se levar em conta, que a dificuldade em se identificar repastos excedendo 48 horas, em parte é devida à degradação muito rápida de albumina, que representa a maior fração do soro. Acresce-se ainda, que a maioria dos anti-soros utilizados para estudo de hábito alimentar é produzida em animais imunizados com soro total, resultando conseqüentemente em anticorpos primariamente dirigidos contra a fração de albumina (TESH et al. 1988).

Considerando que a quantidade de sangue ingerido por culicídeos é sensivelmente superior à de flebotomíneos e culicídeos, além das variáveis que podem influenciar nas taxas de digestão - quantidade de sangue ingerido, temperatura ambiente, diferença entre exemplares da mesma espécie e entre espécies, idade fisiológica e fonte alimentar - o resultado obtido neste estudo representa uma amostra da população para a qual o teste vem corresponder de maneira satisfatória, corroborando com os resultados encontrados pelos demais autores.

6 CONCLUSÕES

1. Diversas concentrações de soro total anti-rato e IgG conjugado à biotina, bem como diluições de avidina foram postas à prova e fazendo uso das menores concentrações testadas, a técnica imunoenzimática (ELISA) de captura permitiu a identificação de sangue ingerido em exemplares de *Lutzomyia longipalpis* alimentados em rato.
2. A técnica pode prover a realização, de pelo menos, noventa testes em duplicata, para a determinação de sangue recém-ingrido, quando utilizados 200µl do eluato na diluição 1:256.
3. Para as trinta amostras utilizadas na quantificação de sangue ingerido, as quais continham repleção em torno de dois quartos a quatro quartos, foi observada detecção de sangue ingerido para valores com títulos até 13,12 log₂.
4. A identificação de repastos sangüíneos com períodos de aproximadamente 12 e 24 horas em *Lutzomyia longipalpis* foi viável de detecção para todas as amostras testadas verificando-se diferença significativa entre os títulos determinados para estes dois grupos. Porém não foi comprovada a presença de sangue no trato digestivo de exemplares após 72 horas de ingestão.

7 REFERÊNCIAS

Aguiar GM, Vilela ML, Soucasaux T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro. V- Preferências alimentares (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81(4): 477-479.

Aguiar GM, Vilela ML, Schuback PA, Lima RB. Ecology of the sandflies of Itaguaí, an area of cutaneous leishmaniasis in the State of Rio de Janeiro. Food preferences (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1987; 82 (4): 583-4.

Aguilar CM, Fernández E, Fernández R, Deane LM. Study of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. The role of domestic animals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1984; 79 (2): 181-195.

Aguilar CM, Fernández E, Fernández R, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera Z, Souza WJS, Coutinho SG. Urban Visceral Leishmaniasis in Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1998; 93 (1): 15-16.

Añez BN, Nieves E, Carzola D, Oviedo M, Yarbuh AL, Valera M. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Merida, Venezuela. III. Altitudinal distribution, age structure, natural infection and feeding behaviour of sanflies and their relation to the risk of transmission. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 1994; 88 (3): 279-287.

Arias JR, Freitas RA. Flebótomos da Amazonia Central do Brasil. I. Resultados obtidos das capturas feitas com iscas humana e equina (Diptera, Psychodidae). **Acta Amazonica** 1977; 7(4): 507-527.

Ashford RW, Desjeux P, de Raadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today** 1992; 8 (3): 104-105.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology** 2000; 30:1269-1281.

Azevedo AC, Rangel EF, Queiroz RG. *Lutzomyia migonei* (França,1920) naturally infected with peripylarian flagellates in Baturite, a focus of cutaneous leishmaniasis in Ceará State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1990; 85(4): 479.

Barbosa FS, Mello DA, Coura JR. Nota sobre a infecção natural de roedores por *Leishmania* sp. nos limites dos Municípios Teresópolis- Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.** 1970; 4 (2): 113-115.

Barbosa GMS, Marzochi MCA, Massard CL, Lima GPS, Confort EM. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em cães, no Município de

Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** 1999; 15 (3): 641-646.

Beier JC, Perkins PV, Wirtz RA, Koros J, Diggs D, Gargan II TP, Koech DK. Bloodmeal identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on *Anopheles* (Diptera: Culicidae) in Kenya. **J. Med. Ent.** 1988; 25 (1): 9-16.

Berman JD. Human leishmaniasis. Clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infec. Dis.** 1997; 24: 687-703.

Blackwell A, Mordue AJL, Mordue W. Identification of bloodmeals of the Scottish biting midge, *Culicoides impunctatus*, by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Med. Vet. Entomol.** 1994; 8:20-24.

Blackwell A, Brown M, Mordue W. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* bloodmeals in host-preference studies. **Med. Vet. Entomol.** 1995; 9: 214-218.

Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum D, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1999; 93: 488-494.

Burkot TR, Goodman WG, Defoliart GR Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1981; 30 (6): 1336-1341.

Campbell-Lendrum DH, Pinto MC, Brandão-Filho SP, Souza AA, Ready PD, Davies CR. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). **Med. Vet. Entomol.** 1999; 13: 299-309.

Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Amer. Mosq. Control. Assoc.** 1993; 9(2): 196-205.

Christensen HA, Herrer A. Attractiveness of sentinel animals to vectors of leishmaniasis in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1973; 22(5): 578-584.

Christensen HA, Herrer A. Panamanian *Lutzomyia* (Diptera:Psychodidae). Host attraction profiles. **J. Med. Ent.** 1980; 17(6): 522-528.

Christensen HA, Arias JR, Vasquez AM, Freitas RA. Hosts of sandfly vectors of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the central Amazon of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1982 a; 31(2): 239-242.

Christensen HA, Vasquez AM. The tree- buttress biotope: A pathobiocenose of *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1982 b; 31(2):243-251.

CIPA GROUP- Computer-aided identification of sandflies of America 1999; <<http://cipa.snv.jussieu.fr>>

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. **J. Med. Ent.** 1995; 32 (3): 229-233.

Comer JA, Irby WS, Kavanaugh DN. Hosts of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia, USA. **Med. Vet. Entomol.** 1994; 8:325-330.

Consales CA. **Avaliação de vacinas anti-rábicas produzidas em cultivo celular, utilizando modelo de camundongos imunogeneticamente selecionados.**São Paulo; 1999.[Tese de Doutorado- Instituto de Ciências Biomédicas – USP].

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Morales A, Ferro de Carrasquilla C, Young DG, Kreutzer RD, Boshell J, Paláu MT, Caceres E, Peláez D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1989a; 40:480-486.

Corredor A, Gallego JF, Tesh RB, Peláez D, Diaz A, Montilla M. Paláu MT. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani chagasi* in Colombia, South America. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1989b; 83:195.

Courtenay O, Santana EW, Johnson PJ, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW. Visceral leishmaniasis in the hoary zorro *Dusicyon vetulus*: a case of mistaken identity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1996; 90: 498-502.

Coutinho SG, Nunes MP, Marzochi MCA, Tramontano N. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1985; 80 (1): 17-22.

Deane MP, Deane LM. Infecção natural do *Phlebotomus longipalpis* por *Leptomonas*, provavelmente de *Leishmania donovani*, em um foco de calazar, no Ceará. **Hospital** 1954; 45 (6):35-40.

Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar, no Ceará. **Hospital**, R. Janeiro 1955; 48:61-76.

Dedet JP. *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. **Ann. L'Inst. Pasteur** (actualités) 1993; 4:3-25.

Dourado MIC, Noronha CV, Alcantara N, Ichihara MYT, Loureiro S. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil). **Rev. Saúde Pública** 1989; 23 (1): 2-8.

Edrissian GH, Hafizi A. Application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to identification of *Anopheles* mosquito bloodmeals. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1982; 76(1): 54-56.

Edrissian GH, Manouchehry AV, Hafizi A. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of the human blood index in anopheline mosquitoes collected in Iran. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 1985; 1:349-352.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VRD, Jesus AC, Alencar JTA. Participação do cão no ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana no Município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81(2): 155-163.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momem H, Grimaldi-Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1991; 86(4):499-500.

Falqueto A. **Especificidade alimentar de flebotomíneos em duas áreas endêmicas de Leishmaniose Tegumentar no Estado do Espírito Santo.** Rio de Janeiro; 1995. [Tese de Doutorado- Instituto Oswaldo Cruz- Fundação Oswaldo Cruz].

Forattini OP. Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo** 1960; 2(4): 195-203.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecções naturais de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1972; 6:255-261.

Forattini OP. **Entomologia Médica.** São Paulo: Edgar Blucher- EDUSP; 1973.

Forattini OP, Pattoli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1973; 7:181-184.

Galati EAB. **Sistemática de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) das Américas.** São Paulo; 1990. [Tese de Doutorado- Faculdade de Saúde Pública/USP].

Galati EAB, Nunes VL, Rego-Jr FA, Oshiro ET, Rodrigues M. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1997; 31 (4):378-90.

Galati EAB. **Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Biologia, Classificação, Terminologia, Morfologia e Identificação de Adultos.** S. Paulo. Apostila do Curso de Entomologia Médica, Faculdade de Saúde Pública/USP 2002.

Gentry JW, Moore CG, Hayes DE. Preliminary report on soluble antigen fluorescent antibody technique for identification of host source of mosquito blood meals. **Mosquito News** 1967; 27:141-143.

Gomes AC, Galati EAB. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana. 7- Capacidade vetorial flebotomínea em ambiente florestal primário do sistema da Serra do Mar, Região do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública** 1989; 23(2): 136-142.

Gomes AC. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia** , 1992; 67 (2): 55-60.

Gomes AC. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1994; 89 (3): 457-460.

Gomes LAM, Duarte R, Lima DC, Diniz BS, Serrão ML, Labarthe N. Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 2001; 96 (5): 693-695.

Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **J. histochem. Citochem.** 1979; 27 (8): 1131-1139.

Guy MW, Killick-Kendrick R, Gill GS, Rioux J-A Bray RS. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 19. Determination of the hosts of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 in the Cévennes by bloodmeal analyses. **Ann. Paras. Hum. Comp.** 1984; 59: 449-458.

Herrer A, Telford SR. *Leishmania braziliensis* isolated from sloths in Panama. **Science** 1969; 164: 1419-1420.

Herrer A, Christensen HA, Beumer RJ. Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis among panamanian forests mammals. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 1973; 22: 583.

Hunter FF, Bayly R. ELISA for identification of blood meal source in black flies (Diptera: Simuliidae). **J. Med. Ent.** 1991; 28 (4): 527-532.

Irby W, Apperson CS. Hosts of mosquitoes in the Coastal plain of North Carolina. **J. Med. Ent.** 1988; 25(2): 85-93.

Killick-Kendrick R, Ward RD. Ecology of *Leishmania*. **Parasitology** 1981; 82: 143-152.

Killick-Kendrick R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med. Vet. Entomol.** 1990; 4: 1-24.

King WV, Bull CG. The blood feeding habits of malaria-carrying mosquitoes. **Am. J. Hyg.** 1923; 3: 491-496.

Lacerda MM. The brazilian leishmaniasis control program. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1994; 89 (3): 489-495.

Lainson R, Strangways-Dixon J. The epidemiology of dermal leishmaniasis in British Honduras: Part II. Reservoir-hosts of *Leishmania mexicana* among the forest rodents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1964; 58 (2): 136-153.

Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis in Brazil. III- Cutaneous leishmaniasis in an opossum *Marmosa murina* (Marsupialia, Didelphidae) from the lower Amazon region. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1969; 63: 738-740.

Lainson R, Shaw JJ. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA. **Biology of Kinetoplastida** vol 2. Academic Press London New York & San Francisco; 1979. p.1-116.

Lainson R, Shaw JJ, Ready PD, Miles MA, Póvoa M. Leishmaniasis in Brazil: XVI: Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *Leishmania braziliensis guyanensis* causative agent of "pian bois". **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1981; 75: 530-536.

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. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1985; 79: 223-226.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FJ, Braga RR, Ryan L, Povoá MM, Ishikawara EAY. **A Leishmania e as leishmanioses- Instituto Evandro Chagas- 50 anos de contribuição às Ciências Biológicas e à Medicina Tropical.** Vol.1; 1986.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. **The Leishmaniases in Biology and Medicine.** Vol.1. Academic Press Inc. London; 1987.

Lainson R, Dye C, Shaw JJ, Macdonald DW, Courtenay O, Souza AAA, Silveira FT. Amazonian Visceral Leishmaniasis- Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1990; 85 (1): 135-137.

Lewis DJ, Ward RD. Transmission and vectors. In: Peters W, Killick-Kendrick R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine.** Vol.1. Academic Press Inc. London; 1987.

Luz BE, Membrive N, Castro EA, Dereure J, Pralong F, Dedet JA, Pandey A, Thomaz-Soccol V. *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) as vector of

Leishmania (V.) braziliensis in Paraná state, southern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 2000; 94 (6) 623-631.

Marcondes CB. A redescription of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); and resurrection of *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1996; 91: 457-462.

Marcondes CB, Lozonei AL, Vilela JH. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 1998; 31: 51-58.

Mello DA, Rego-Jr FA, Oshozo E, Nunes VLB. *Cerdocyon thous* (L.) (Carnivora, Canidae) naturally infected with *Leishmania donovani chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) in Corumbá (Mato Grosso do Sul State, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1988, 83 (2):259.

Miles MA, Vexenat JA, Campos JHF, Castro JAF. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: **Proceedings of the Internatinal Canine Leishmaniasis Forum**; 1999; Barcelona, Spain, Hoechst Roussel Vet.; 1999, p.46-53.

Montoya-Lerma J, Lane RP. Factors affecting host preference of *Lutzomyia evansi* (Diptera:Psychodidae) a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. **Bull. Ent. Res.** 1996; 86:43-50.

Morrison AC, Ferro C, Tesh RB. Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* at an endemic focus of american visceral leishmaniasis in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1993; 49 (1): 68-75.

Nery- Guimarães F, Azevedo M. Roedores silvestres (*Oryzomys goeldi*) da Amazônia com infecção natural por *Leishmania*. **O Hospital** 1964; 66:279-285.

Ngumbi PM, Lawyer PG, Johnson RN, Kiilu G, Asiago C. Identification of phlebotomine sandfly bloodmeals from Baringo district, Kenya, by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Med. Vet. Entomol.** 1992; 6: 385-388.

Niebylski ML, Savage HM, Nasci RS, Craig Jr. GB. Blood hosts of *Aedes albopictus* in the United States. **J. Amer. Mosq. Control Assoc.** 1994; 10 (3):447-450.

Ogusuku BE, Perez JE, Paz L, Nieto E, Monje J, Guerra H. Identification of bloodmeal sources of *Lutzomyia spp* in Peru. **Ann. Trop. Med. Parasit.** 1994; 88 (3): 329-335.

Pant CP, Houba V, Engers HD. Bloodmeal identification in vectors. **Parasitology Today** 1987; 3 (11): 324-326.

Pessoa SB, Martins AV. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro- RJ: Guanabara-Koogan S.A.; 1977.

Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. **J. Immunol. Methods.** 1992; 150 (1-2): 5-21.

Queiroz RG, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Pessoa FAC, Sousa RN, David JR. Cutaneous leishmaniasis in Ceara State in northeastern Brazil: Incrimination of *Lutzomyia whitmani* (Diptera:Psychodidae) as a vector of *Leishmania braziliensis* in Baturite Municipality. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 1994; 50 (6): 693-698.

Quinnell RJ, Dye C, Shaw JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Med. Vet. Entomol.** 1992; 6:195-200.

Quinnell RJ, Dye C. An experimental study of the peridomestic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **Bull Ent. Res.** 1994; 84: 379-382.

Rangel EF, Souza NA, Wermelinger ED, Azevedo ACR, Barbosa AF, Andrade CA. Flébotomos de Vargem Grande, foco de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1986; 81(3): 347-349.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sanfly fauna (Diptera:Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1990; 85(1): 39-45.

Rice JB, Barber AM. Malaria studies in Greece. A modification of the Uhlenhuth-Weidanz precipitin test for determining the source of bloodmeals in mosquitoes and other insects. **J. Lab. Clin. Med.** 1935; 20: 876-883.

Rubio- Palis Y, Curtis CF, Gonzáles C, Wirtz RA. Host choice of anopheline mosquitoes in a malaria endemic area of western Venezuela. **Med. Vet. Entomol.** 1994; 8: 275-280.

Santos SO, Arias JA, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med. Vet. Entomol.** 1998; 12: 315-317.

Savage HM, Niebylski ML, Smith GC, Mitchell CJ, Craig-Jr GBJ. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera:Culicidae) at a temperate North American site. **J. Med. Ent.** 1993; 30 (1): 27-34.

Service MW, Voller A, Bidwell DE. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of blood-meals of haematophagous insects. **Bull. ent. Res.** 1986; 76: 321-330.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: VI. Observations on the seasonal variations of *Lutzomyia flaviscutellata* in different types of forest and its relationship to enzootic rodent leishmaniasis (*Leishmania mexicana amazonensis*). **Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.** 1972; 66(5): 709-717.

Sherlock IA, Guitton N. Observações sobre calazar em Jacobina, Bahia. III. Alguns dados sobre *Phlebotomus longipalpis*, o principal transmissor. **Rev. bras. Malar.** 1969; 21(3):541-548.

Silva OS, Grunewald J. Contribution to the sandfly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1999; 94 (5):579-582.

Souza MA, Sabroza PCT, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS de. Leishmaniose visceral no Rio de Janeiro. 1. Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1981; 76 (2):161-168.

Taniguchi HH. **Observações ecológicas de flebotomíneos em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana no Município de Eldorado, Vale do Ribeira, Estado de São Paulo, Brasil, período de 1996-1997.** São Paulo; 2000 [Dissertação de Mestrado- Faculdade de Saúde Pública da USP].

Tempelis CH, Lofy MF. A modified precipitin method for identification of mosquito blood-meals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1963; 12: 825-831.

Tempelis CH. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of bloodmeals by serology. **J. Med. Ent.** 1975; 11 (6): 635-653.

Tesh RB, Chaniotis BN, Aronson MD, Johnson KM. Natural host preferences of panamanian phlebotomine sandflies as determined by precipitin test. **Am. J. Trop. Med Hyg.** 1971; 20 (1) 150-156.

Tesh RB, Chaniotis BN, Carrera BR, Johnson KM. Further studies on the natural preferences on Panamanian phlebotomine sandflies. **Am. J. Epidemiol.** 1972; 95(1): 88-93.

Tesh RB, Chen WR, Catuccio D. Survival of albumin, IgG, IgM and complement (C3) in human blood after ingestion by *Aedes albopictus* and *Phlebotomus papatasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1988; 39 (1): 127-130.

Tolezano JE, Luvizotto MCR, Uliana SRB, Araujo MFL, Taniguchi HH, Barbosa JAR, Pinto PLS, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Leishmaniose visceral americana (LVA) em Araçatuba, região oeste do Estado de São Paulo. Investigações laboratoriais e diagnóstico etiológico de uma doença emergente em terras paulistas. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.** 1999; 32 (Suplemento I) :218.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1994; 89 (3):427-434.

Voller A, Bidwell D, Huldt G, Engvall E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bull WHO** 1974; 51: 209- 211.

- Washino RK, Else JG. Identification of blood meals of hematophagous arthropods by the hemoglobin crystalization method. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** 1972; 21: 120-122.
- Washino RK, Tempelis CH. Mosquito host bloodmeal identification: Methodology and data analysis. **Ann. Rev. Entomol.** 1983; 28:179-201.
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. **World Health Organization Technical Report Series** 1990, 793: 8-67.
- Weitz,B. Identification of blood meals of bloodsucking arthropods. **Bull. WLD. Hlth. Organ.** 1956; 15: 473-490.
- Weitz B. Feeding habits of bloodsucking arthropods. **Exp. Parasitol.** 1960; 9: 63-82.
- Yaghoobi-Ershadi MR, Javadian E, Kannani A. Host preference pattern of phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran. **Acta. Trop.** 1995; 60: 155-158.
- Yolken RH. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. **Rev. Infect. Dis.** 1982; 4 (1): 35-68.
- Yoshida ELA, Corrêa FMA, Marques AS, Stolf HO, Dillon NL; Momem H, Grimaldi-Jr G. Human canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1990; 85(1): 133-134.