

Artigo original

Identificação de antropofagia em fêmeas de *Aedes aegypti* visualmente classificadas como não ingurgitadas

Identification of anthropophagy in female Aedes aegypti visually classified as non-engorged

Valdemir Orestes Garrido Júnior

Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), Laboratório de Entomologia Aplicada (LLEnA), Marília. São Paulo, Brasil.

RESUMO

Recentemente o Brasil sofreu com diversas epidemias de diferentes arboviroses, acometendo milhares de pessoas. Devido a isso, as autoridades de saúde pública têm realizado estudos de novas estratégias de combate ao mosquito *Aedes aegypti*, visando diminuir o número de pessoas afetadas por essas doenças, tanto por medidas de controle da infestação, quanto por medidas que visam diminuir o contato homem-vetor. Esse estudo teve como objetivo analisar fêmeas de *Aedes aegypti* classificadas como estágio 1 de Sella e evidenciar sua importância como parâmetro de avaliação de estratégias de diminuição do contato homem-vetor. O método utilizado para investigar a proporção de fêmeas que se alimentaram de sangue humano foi o ensaio imunoenzimático (ELISA). As fêmeas de mosquitos processadas nesse estudo foram capturadas em 3 regiões distintas da cidade de Marília-SP. Os ensaios evidenciaram a importância do processamento de fêmeas em todos os graus de digestão sanguínea, pois mesmo as que visualmente não continham a presença de sangue em seu abdômen apresentaram alto percentual de positividade para sangue humano. Demonstra-se que a utilização da proporção de fêmeas alimentadas com sangue humano pode ser um índice interessante para avaliar estratégias protetivas de diminuição do contato homem-vetor.

PALAVRAS-CHAVE: *Aedes*. Controle de Vetores. Entomologia/métodos. ELISA.

ABSTRACT

Recently, Brazil has suffered several epidemics of different arboviruses, affecting thousands of people. For this reason, public health authorities have conducted studies of new strategies to combat the *Aedes aegypti*, with a view to assuring declined number of people affected by these diseases through measures aimed to reduce the contact with human-vector. The purpose of the research was to analyze females of *Aedes aegypti*, classified as Sella Stage 1 and to highlight its importance as a parameter for evaluating strategies to decrease human-vector contact. The method used to investigate the proportion of females fed on human blood was the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The females processed in this research were captured in 3 different regions in the city of Marília-SP. The researches emphasized the importance of processing females in all grades of blood digestion because even those that visually did not contain the presence of blood in their abdomen reported a high percentage of positivity for human blood. Moreover, it is proven that the application of the proportion of females fed with human blood can be an interesting level to evaluate reduction of human-vector contact's protective strategies.

KEYWORDS: *Aedes*. Vectors control. Entomological surveillance. ELISA.

INTRODUÇÃO

Após a emergência de novas arboviroses no Brasil, o mosquito *Aedes aegypti* teve sua importância para a saúde pública reforçada. Além dos milhares de casos de dengue registrados anualmente, ocorreram epidemias de febre chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika em vários estados do país.¹ Além da limitação causada pela infecção viral, outras doenças estão associadas a essas arboviroses, como por exemplo, a ocorrência de casos de síndrome de Guillain-Barré após infecções por chikungunya e Zika^{2,3} e acometimentos neurológicos em recém-nascidos cujas mães foram infectadas durante a gestação.^{4,6} No

Brasil, o *Ae. aegypti* é o mosquito de maior importância na transmissão destes arbovírus. Está fortemente adaptado ao ambiente urbano, utilizando-se tanto de recipientes naturais quanto artificiais para a postura de seus ovos; apresenta hábito diurno, com maior atividade durante o amanhecer e o crepúsculo. Após a cópula, a fêmea do *Ae. aegypti* tem o seu estímulo para a hematofagia aumentado, pois os aminoácidos presentes no sangue são essenciais para o desenvolvimento dos ovos.^{7,8} Devido ao seu alto antropofilia, tende a picar preferencialmente o ser humano. Devido à longa associação com o homem, a seleção

natural dotou-lhes de certas habilidades, como a de interromper a realização do repasto sanguíneo à menor movimentação dos hospedeiros, além de realizar múltiplos repastos em vários indivíduos até que esteja totalmente satisfeita. Devido a essa grande persistência, a fêmea de *Ae. aegypti* tornou-se uma forte disseminadora de agentes infecciosos.^{7,8}

A dificuldade de se obter sucesso com as medidas empregadas para diminuir os níveis de infestação do *Ae. aegypti* induziu a busca de alternativas que diminuam o contato humano-vetor, avaliem o risco de transmissão e direcionem as estratégias de controle. Segundo Gomes⁹ os índices larvários vêm sendo mais utilizados devido a sua facilidade de execução. Já Focks¹⁰ questiona os índices tradicionais baseado em investigações larvárias, demonstrando suas deficiências e propondo uma análise baseada em número de pupas (estágio intermediário entre larva e forma adulta) e que considera a produtividade por recipientes, mas mesmo assim acabam não refletindo o real nível de exposição. Para um resultado mais próximo ao verdadeiro a captura de alados seria o método mais efetivo, apesar de pouco difundido, devido às dificuldades operacionais.^{9,11}

Os mosquitos capturados apresentam parâmetros que permitem caracterizar melhor a situação entomológica e epidemiológica, uma vez que a caracterização de mosquitos com idades diferentes tem significados distintos e permitem estimar a continuidade da transmissão.¹¹ Dentre os mosquitos resultantes das capturas, pode-se realizar análises taxonômicas como identificação da espécie, sexo, avaliar o estágio gonotrófico e estimar a sua idade fisiológica. Os estudos sobre

estágios gonotróficos iniciam-se a partir das análises de Massimo Sella,¹² em que ele sugere que, a partir a observação da aparência externa do abdômen e da digestão do sangue ingerido, pode-se correlacionar com o desenvolvimento ovariano, dividindo-as em 7 estágios, os quais ficaram conhecidos como *Fases de Sella*⁸ – diferenciação de fêmeas vazias e com sangue e maturação de óvulos (Figura 1). Outros autores também realizaram estudos sobre o estágio gonotrófico como Charlwood,¹³ Clements,¹⁴ Detinova,¹⁵ mas observando diretamente a anatomia ovariolar. A determinação da idade das fêmeas de culicídeos em modo geral é bem importante, pois fornece informações sobre a taxa de sobrevivência diária que está estritamente ligada à capacidade vetora. Além disso, torna possível formular e testar modelos de dinâmicas populacionais porque fêmeas da mesma espécie, mas de idades diferentes, podem apresentar mudanças de comportamento e distribuição.^{8,13}

A identificação da origem do repasto sanguíneo pode ser realizada por diferentes técnicas, dentre elas o ensaio imunoenzimático (ELISA). Após estudos realizados por Chow,¹⁶ verificou-se que o método *Sandwich-B* mostrou-se superior a outros métodos para esse fim. Além disso, esse estudo também indica uma correlação entre o tempo de digestão sanguínea e a detecção pela técnica, por isso tende-se a utilizar preferencialmente, nos ensaios de ELISA, apenas fêmeas ingurgitadas. Devido à superioridade do método, ele já foi empregado e adaptado por outros autores a fim de analisar o hábito alimentar de outras espécies de culicídeos¹⁷⁻²⁰ e também para flebotomíneos.²¹ A positividade para antropofagia também pode ser utilizada como um indicador para avaliar efetividade

de ações de intervenção que estejam sendo realizadas.

O presente estudo teve como objetivo analisar fêmeas de *Aedes aegypti* classificadas como grau 1 de Sella e sua importância como parâmetro de avaliação de estratégias de diminuição do contato homem-vetor.

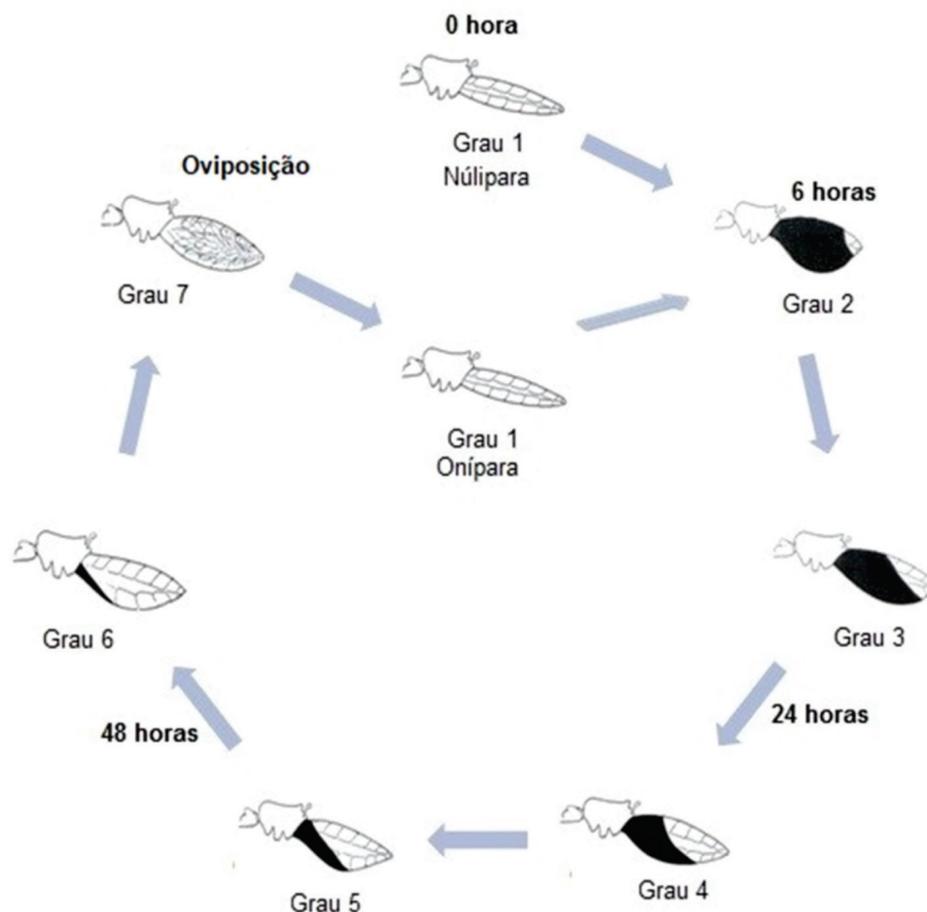
MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo analisou as amostras coletadas de um projeto que está sendo realizado para avaliar a efetividade de novas estratégias para o controle do mosquito *Ae. aegypti*.

As capturas de formas aladas de culicídeos foram realizadas mensalmente na área urbana

no município de Marília/SP, no período das 8h às 13h, de outubro de 2017 a setembro de 2018 (figuras 2 e 3). As capturas foram realizadas por 3 duplas, seguindo a metodologia de Clark²² em 300 imóveis em Marília/SP, tanto no peridomicílio quanto no intradomicílio.

Os mosquitos capturados foram colocados em tubos plásticos adaptados, levados vivos ao Laboratório de Entomologia Aplicada – LLEnA e mantidos em freezer a -20° durante 1 hora para preservar o grau de digestão sanguínea. Posteriormente, foi realizada a identificação taxonômica e a classificação do grau de ingurgitamento seguindo o critério de Sella.^{8,12-15,23} As fêmeas foram classificadas com as fases de Sella assim definidas:



Fonte: Criado a partir de modificações no diagrama de Forattini⁸

Figura 1. Ciclo gonotrófico do *Aedes aegypti* seguindo a metodologia de Sella



Figura 2. Localização do município de Marília, ESP.



Figura 3. Área urbana de Marília/SP e as regiões de captura

Grau 1: Abdômen apresenta-se delgado, longo e visualmente sem sangue.

Grau 2: Abdômen mostra-se dilatado, o estômago repleto de sangue, com coloração bem avermelhada, com apenas os dois últimos esternitos (parte ventral) e os três últimos tergitos (parte dorsal) não apresentando sangue.

Grau 3: Estômago continua cheio de sangue, de coloração avermelhada, apresentando 2 a 2,5 esternitos e 4 a 5 tergitos livres de sangue.

Grau 4: O sangue no estômago apresenta coloração preta, de 2,5 a 3 esternitos e 6,5 tergitos livres de sangue.

Grau 5: Observa-se a coloração preta do sangue no estômago, de 2,5 a 3,5 esternitos e 6,5 tergitos livres de sangue.

Grau 6: O sangue no estômago apresenta coloração preta ocupando os esternitos de 1 a 3.

Grau 7: Não se percebe a existência de sangue no estômago e o abdômen está dilatado e preenchido com os ovos.

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado seguindo o protocolo estabelecido por *LLEN A*,²⁴ elaborado a partir de modificações do protocolo descrito por SEI.²¹ Os anti-soros e os conjugados peroxidase utilizados foram Kirkegaard & Perry Laboratories – KPL, comercializados pela SINAPSE™. Foram utilizadas placas de microtitulação, de acrílico com fundo em U, rígidas, com 96 poços da COSTAR™[®]3366. Para confecção das soluções PBS (“Phosphate Buffered Saline”) e PBS-Tween, foram utilizados fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato de sódio dibásico anidro, cloreto de sódio e Tween[®] 20, todos da marca Sigma™.^{21,24} O aparelho utilizado para realizar o teste foi o leitor de microplaca (MULTISKAN EX – Primary EIA – V. 2.1-0[®]).²⁴

As fêmeas de *Ae. aegypti* foram colocadas individualmente em microtubos tipo eppendorf de 1,5ml com rosca e adicionados 50µl de PBS 1X, e triturados com o uso de pistilo de polipropileno. Em seguida foram adicionados 350µl de PBS 1x, perfazendo o volume final de 400µl e armazenado o homogenato devidamente codificado em caixa plástica para microtubos em freezer -20°C. A fim de se monitorar a ocorrência de resultados falsos positivos, foi utilizado um

triturado de machos de *Aedes aegypti* como controle negativo, processado seguindo o mesmo método descrito acima. Como controle da positividade das amostras, foi utilizado sangue humano em diluição 1/400µl, e para detectar uma possível ocorrência de reação cruzada, foi utilizado um sangue heterólogo, no caso um sangue de origem não humana, também em mesma diluição 1/400µl.²⁴

Execução da Técnica

- As microplacas foram sensibilizadas com 30µl/poço com anticorpos monoclonais IgG anti-humano diluído em PBS e incubadas por 1 hora a 37°C, após isso foi realizada lavagem tripla com PBS-T.
- Após a lavagem, foi realizado o bloqueio das microplacas utilizando solução de leite em pó MOLICO™ desnatado a 5%, 200µl/poço e incubadas por 1 hora, em seguida foi realizada lavagem tripla com PBS-T.
- Posteriormente ao bloqueio, eram adicionadas as amostras dos mosquitos, blank, sangue heterólogo, e dos controles negativo e positivo (30µl/ poço) e foram incubadas por 2 horas e lavadas 3 vezes com PBS-T.
- Em seguida, era adicionada à microplaca a enzima peroxidase diluída em PBS 1X (30µl/ poço), realizada a incubação por 1 hora, lavagem tripla com PBS-T e uma lavagem adicional com água deionizada.

- Por fim, era adicionado o cromógeno ABTS (100µl/poço), incubado e realizada a leitura (em comprimento de onda de 405nm).²⁴

Para classificação das reações, foi calculado o linear de reatividade (Cut Off) diariamente e exclusivo para cada placa, utilizou-se da seguinte equação, onde (CO = X + 3 DP), X= média da absorbância dos controles negativos e DP= desvio padrão. Os valores acima do cut off foram considerados reagentes.²⁴

RESULTADOS

No período de outubro de 2017 a setembro de 2018 foi processado um total de 926 fêmeas de *Ae. aegypti*. Estas fêmeas foram classificadas de acordo com o grau de digestão sanguínea, segundo critério de Sella (Tabela 1).

Optou-se por agrupar os resultados em trimestres para minimizar as variações ocasionais observadas por mês de captura. Foram agrupados da seguinte maneira: outubro, novembro e dezembro/2017; janeiro, fevereiro e março/2018; abril, maio e junho/2018; julho, agosto e setembro/2018. Do total de fêmeas processadas nesse estudo, 371 foram classificadas como reagentes para pesquisa de

sangue humano, indicando uma positividade de 40,1% das amostras analisadas. Dentre as 262 fêmeas classificadas como estágio 1, ou seja, visualmente ‘vazias’, 24 foram reagentes para sangue humano.

Tabela 1. Total de fêmeas de *Aedes aegypti* processadas no ensaio imunoenzimático, classificadas conforme o grau de digestão sanguínea. Marília 2018.

Grau de Sella	Nº de fêmeas	Percentual (%)	Nº de fêmeas reagentes para sangue humano
1	262	28,3	24
2	201	21,7	180
3	87	9,4	59
4	104	11,2	54
5	254	27,4	50
6	5	0,5	3
7	13	1,4	1
Total	926	100,0	371

O percentual de positividade para sangue humano em fêmeas de *Ae. aegypti* categorizadas como ingurgitadas se manteve em todos os trimestres entre 40 e 60%. As fêmeas classificadas como estágio 1 de Sella, apesar de visualmente não apresentarem presença de sangue, também foram positivas entre 7,7% e 12,5% nos trimestres avaliados. (Tabela 2 e Figura 4)

Tabela 2. Número de fêmeas de *Aedes aegypti* processadas, positivas para sangue humano e seus respectivos percentuais. Marília 2018

Período	Estágio 1 de Sella			Estágios (2 – 7) de Sella		
	Nº de fêmeas processadas	Nº de fêmeas positivas para sangue humano	Percentual de fêmeas positivas para sangue humano (%)	Nº de fêmeas processadas	Nº de fêmeas positivas para sangue humano	Percentual de fêmeas positivas para sangue humano (%)
4º trimestre/2017	63	6	9,5	158	99	62,7
1º trimestre/2018	115	10	8,7	254	132	52,0
2º trimestre/2018	52	4	7,7	172	68	39,5
3º trimestre/2018	32	4	12,5	80	48	60,0
Total	262	24	9,2	664	347	52,3
Média			9,6			53,5
Desvio Padrão			2,1			10,4

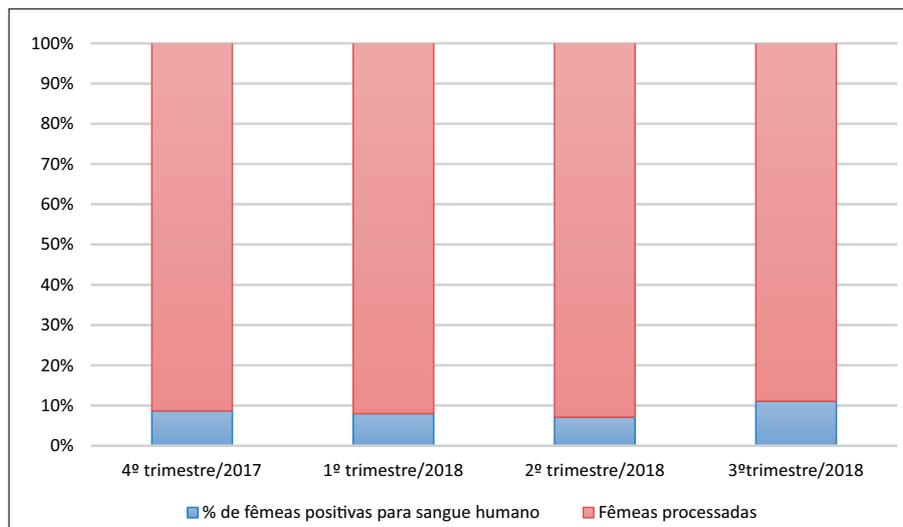


Figura 4. Percentual de positividade de sangue humano em fêmeas de *Aedes aegypti* (estágio 1 de Sella) por trimestre. Marília 2018

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, cerca 28,3% (262/926) das fêmeas processadas foram visualmente classificadas como não ingurgitadas. Em relação a captura dos mosquitos, cabe ressaltar que tal estudo foi realizado na área urbana da cidade de Marília, sujeito a variações no grau de infestação causadas por ações dos órgãos municipais de saúde, como Bloqueio de Controle de Criadouros BCC, nebulizações, campanhas de limpeza.

Alguns fatores dificultam o controle da infestação do mosquito *Ae. aegypti*, como a sua grande adaptação ao ambiente urbano,^{7,8} a falta de colaboração e bons hábitos dos cidadãos,²⁵ o surgimento de populações resistentes aos inseticidas disponíveis.^{26,27} Além disso, sua associação ao ser humano levou ao desenvolvimento de algumas características que são fatores importantes a se considerar. As fêmeas de *Ae. aegypti* são consideradas sugadoras agressivas e persistentes, ou seja, mesmo que seja necessário interromper o repasto sanguíneo momentaneamente, ela

retornará a picar o alvo ou poderá trocar de vítima, caso haja múltiplas opções no ambiente. Ela repetirá suas investidas até que tenha sugado a quantidade de sangue necessária para a maturação de seus ovos.^{7,8} Somada a essas características, a competência vetorial da espécie a torna grande dispersadora de arbovírus, como os habituais quatro sorotipos do dengue vírus, febre amarela em sua forma urbana,^{7,8} além dos vírus Zika e chikungunya¹ e outros emergentes como Mayaro.^{8,28}

Por isso, a utilização de estratégias protetivas podem ser alternativa interessante para a diminuição da exposição do homem ao vetor, principalmente os grupos de risco, como gestantes, idosos e crianças. O uso de telas e mosquiteiros, principalmente alguns tipos impregnados com inseticidas, é estudado principalmente em áreas endêmicas de malária em regiões da África.²⁹ O IRS (Indoor Residual Spray) é listado como estratégia de escolha no manual de controle da Zika vírus,³⁰ estratégia que visa borrifar as paredes e os

locais preferenciais de repouso do mosquito de forma a diminuir sua quantidade interior das residências. Também são adotados o uso de substâncias repelentes, tanto em forma de uso tópico quanto por meio de vaporizadores ou velas, como por exemplo N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), icaridina, citronela (*Cymbopogon winterianus*), manjeriço (*Ocimum basilicum*), óleo de eucalipto-limão (*Corymbia citriodora*) dentre outros.³¹

Para avaliar a efetividade dessas estratégias de diminuição de contato homem-vetor, o levantamento da proporção de fêmeas de *Ae. aegypti* alimentadas com sangue humano seria uma maneira mais confiável. A captura de insetos adultos apenas permite estimar tal contato, sem comprová-lo, e como também são realizadas no peridomicílio, a presença de criadouros próximos à área pode propiciar a captura de fêmeas recém-emergidas, as quais ainda não tenham tido contato com o ser humano, ou fêmeas que tenham realizado o seu repasto sanguíneo em animais como cães, gatos, dentre outros.³² Assim, pode-se ter uma alta densidade de mosquitos em um imóvel e mesmo assim ter um baixo contato homem-vetor, se houver por exemplo a aplicação de IRS ou outras substâncias em alguma das estratégias citadas acima, evitando a entrada e/ou permanência do mosquito na residência.^{29,30,31} Neste sentido, a utilização da proporção de fêmeas alimentadas como sangue humano torna-se uma prova qualitativa interessante para avaliar estratégias protetivas, pois revela o real grau de exposição do homem ao vetor, e como seu levantamento é realizado a partir de provas bioquímicas altamente sensíveis e específicas, torna-se um parâmetro seguro e confiável.

O presente estudo utilizou-se do ensaio imunoenzimático (ELISA), para avaliar a taxa de hematofagia em humanos, por ser um método muito seguro, devido a sua sensibilidade e especificidade. Segundo Sei²¹ e Deus³² a utilização da técnica de ELISA permite detectar concentrações mínimas de sangue e identificar o material várias horas após o repasto. Chow,¹⁶ em estudos realizados em 1993, demonstrou a relação entre o período de digestão do sangue e a detecção pela técnica de ELISA, sendo 100% de detecção em período de até 32 horas após a alimentação e 80% em até 42 horas. Além disso, afirma que a digestão sanguínea pode variar conforme a temperatura ambiente em regiões tropicais, ocorrendo entre 24 a 48 horas, e em regiões temperadas ocorrendo em 1 semana ou mais, variando de espécie para espécie e dependendo do volume de sangue ingerido.

Em relação à positividade total do nosso estudo, 40,1%, comparando com o estudo realizado por Deus,³² também realizado na cidade de Marília-SP, obteve 23,2% (59/254) de positividade para sangue humano em fêmeas de *Ae. aegypti*. Já Chow¹⁶ obteve 86,2%(69/80) de positividade em estudo realizado na Tailândia. Mas diferentemente de um estudo de hábito alimentar, esse estudo não teve o intuito de pesquisar outras fontes alimentares, e sim se teve apenas a avaliar proporção de fêmeas que realizaram o repasto sanguíneo em humanos. Além disso, foram analisadas as fêmeas de *Ae. aegypti* na sua totalidade, independente da origem (intradomicílio e peridomicílio), ou do grau de digestão sanguínea, diferentemente de estudos de hábitos alimentares que utilizam apenas fêmeas visualmente ingurgitadas para a realização de seus ensaios.^{17-20,32} Em

relação à origem, uma vez que, devido à alta antropofilia^{7,8} do mosquito *Ae. aegypti*, já é esperado que os mosquitos capturados dentro das residências apresentem maior proporção de positividade para o sangue humano, o fato do processamento incluir as fêmeas do peridomicílio abre a possibilidade de incluir aquelas que não tenham tido contato com o homem. Dessa forma, esses fatores podem justificar o menor percentual de positividade observado.

CONCLUSÃO

A detecção de sangue humano em fêmeas, as quais são classificadas como não ingurgitadas, demonstra a importância do processamento da totalidade dos mosquitos, uma vez que foi encontrado percentual de positividade nessas fêmeas em todos os trimestres avaliados. Agregar esta possibilidade em outros estudos e avaliações

mostra-se uma alternativa a ser considerada, uma vez que esse percentual seria perdido, devido a utilizarem apenas fêmeas visualmente “alimentadas”. A proporção de fêmeas alimentadas com sangue humano, identificadas a partir de técnicas bioquímicas como o ELISA, pode ser um parâmetro interessante para avaliar a efetividade de medidas protetivas de diminuição do contato homem-vetor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço toda a equipe do Laboratório de Entomologia Aplicada (*LLEnA*), tanto do laboratório quanto de campo, pela amizade e o apoio. Em especial Maria Teresa Macoris Andrighetti, Maria de Lourdes da Graça Macoris, Aline Falcão Filgueiras Anjolette e Akemi Fumonke pelos conselhos, críticas, direcionamento, por suas contribuições a esse trabalho e o conhecimento transmitido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015; 2015 p. 1 a 9.
2. Lebrum G, Chadda K, Reboux A-H, Martinet O, Gaüzère B-A. Guillain-Barré Syndrome after Chikungunya Infection. *Emerging Infectious Diseases*, 2009; 15(3): 495-6. Disponível em <http://doi.org/10.3201/eid1503.071482>
3. Nóbrega MEB, Araújo ELL, Wada MY, Leite PL, Dimech GS, Pércio J. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 2018 Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222018000200309&lng=en; 2018
4. Vargas A, Saad E, Dimech GS, Santos RH, Sivini MAVC, Albuquerque LC, et al. Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionadas ao vírus Zika notificados na região Metropolitana de Recife, Pernambuco. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* [online]. 2016; 25(4): 691-700 Disponível em <http://doi.org/10.5123/S1679-497442016000400003>
5. Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VV, Araújo EB, Ramos RC, Et al. *Ophtalmological Findings in infants*

- with microcephaly and presumable intra-uterus Zika vírus infection. ArqBrasOftalmol [online]. 2016; 79(1): 1-3 Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-2749201600010002&Ing=en
6. Oliveira CS, Vasconcelos PFC. Microcefalia e vírus Zika. J Pediatr.(RJ) [internet]. 2016; 92(2): 103-105 Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002175572016000200103&Ing=en. Consoli R, Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Editora FIOCRUZ; 1994.
 7. Forattini OP. Culicidologia Médica: identificação, biologia, epidemiologia Vol 2. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002
 8. Gomes AC. Medidas dos níveis de controle para aedes (stegomya) aegypti e aedes (stegomya) albopictus em Programa de Vigilância Entomológica. Inf. Epidemiol. Sus [internet]. 1998; 7(3): 49-57. Disponível em http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-16731998000300006&Ing=pt.
 9. Focks DA. A review of entomological sampling methods and indicators for dengue vectors. Gainesville: World Health Organization; 2003
 10. Reiter P, Nathan MB. Guidelines for assessing the efficacy of insecticidal space sprays for control of the dengue vector Aedes aegypti. Geneva: World Health Organization; 2001.
 11. Sella M. Relazione della campagna anti-anofelica di Humicino (1919) con speciale riguardo alla biologia degli Anofelied agli Anofeli infetti. Ann. Igiene, 1920; 30: Supp. 85.
 12. Charlwood JD, Rafael JA, Wilkes TJ. Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. ACTA AMAZONICA 10(2): 311-33. 1980
 13. Clements AN. The biology of mosquitoes. London, Chapman e Hall, 1992, Voll Development, nutrition and reproduction.
 14. Detinova TS. Age-grouping methods in diptera of medical importance. Geneva. World Health Organization. 1962
 15. Chow E, Wirtz RA, Scott TW. Identification of blood meals in *Aedes aegypti* by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J. Am. Mosq. Control. Assoc. 1993; 9: 196-205.
 16. Mucci LF, Cardoso Júnior RP, Paula MB, Scandar SAS, Pacchioni ML, Fernandes A, et al. Feeding habits of mosquito (Diptera: Culicidae) in area of sylvatic transmission of yellow fever in the state of São Paulo, Brazil. J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis [internet]. 2015; 21:1-10 Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992015000100316&Ing=en.
 17. Marassá AM, Rosa MDB, Gomes AC, Consales CA. Biotin/avidin sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis [internet]. 2008; 14(2):303-3 Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992008000200008&Ing=en.
 18. Laporta GZ, Crivelaro TB, Vicentin EC, Amaro MS, Sallum MAM. Culex nigripalpus Theobald (díptera, Culicidae) Feeding habit at the Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Entomol [Internet]. 2008; 52(4): 663-668. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262008000400019&Ing=en.

19. Laporta GZ. Ecologia de *Culex quinquefasciatus* e de *Culex nigripalpus* no Parque Ecológico do Tietê, São Paulo, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2008.
20. Sei IA. Dípteros da Sub-Família Phlebotominae: Padronização da Técnica imunoenzimática (ELISA) para detecção de fontes alimentares sanguíneas. São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2009.
21. Clark GG, Seda H, Gubler DJ. Use of the “CDC backpack aspirator” for surveillance of *Aedes aegypti* in San Juan Puerto Rico. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 1994;10: 119-24.
22. World Health Organization. Manual on practical entomology in malaria /prepared by WHO Division of Malaria and Other Parasitic Diseases. Geneva. 1995
23. Anjolette AF, Andrighetti MTM, Macoris MLG. Elaboração do procedimento operacional padrão para protocolo de identificação para hábito alimentar de sangue humano por métodos imunoenzimático de culicídeos, para o laboratório de entomologia aplicada da superintendência de controle de endemias. Marília: SUCEN: 2018.
24. Macoris MLG, Mazine CAB, Andrighetti MTM, Yasumaro S. Factors favoring houseplant container infestation with *Aedes aegypti* larvae in Marília, São Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health* 1(4); 1997
25. Braga I, Valle D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília,16(4):279-93; 2007
26. Macoris MLG. Mecanismos de resistência de *Aedes aegypti* L. (Diptera:Culicidae) a inseticidas [tese de doutorado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP; 2011
27. Lopez N, Nozawa C, Linhares REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 5(3):55-64; 2014
28. Mugisha F, Arinaitwe J. Sleeping arrangements and mosquitos net use among under-fives:results from the Uganda Demographic and Health Survey. *Malaria Jour.* 2003;2(40): 1-10
29. World Health Organization. Vector control operations framework for Zika virus. WHO Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Geneva. 2016
30. Santiago AC. Uso de repelentes naturais como estratégia de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão de literatura. [monografia de bacharelado]. Governador Mangabeira – Ba, Faculdade Maria Milza 2017.
31. Deus JT. Hábito alimentar de *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* e sua implicação na capacidade reprodutiva. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Correspondência/Correspondence to:

Valdemir Orestes Garrido Júnior
E-mail: vjrgarrido@gmail.com