

Técnicas para manutenção de *Aedes aegypti* em laboratório

Techniques for the Aedes aegypti maintenance in the laboratory

Aline Falcão Filgueiras Anjolette; Maria de Lourdes da Graça Macoris

Superintendência de Controle de Endemias de Marília. São Paulo, Brasil

INTRODUÇÃO

Apartir da detecção, em 1985, da reinfestação de *Aedes aegypti* em nove municípios da região oeste no estado de São Paulo,¹ foi necessária a elaboração de um programa de controle para evitar a infestação do Estado e a transmissão de Dengue. Em 1988, a Superintendência de Controle de Endemias (Sucen) estruturou um laboratório em Marília para estabelecer um insetário que produzisse exemplares para estudos de biologia e controle do vetor. Até o presente, com a disseminação da dengue e o risco de febre amarela no Brasil, ainda persiste a necessidade de estudar este vetor, hoje também envolvido na transmissão de outras arboviroses como a febre Chikungunya e Zika. Diante da demanda de produção de insetos e de constantes solicitações sobre as técnicas de criação, este trabalho tem como objetivo descrever as metodologias de manutenção de *Aedes aegypti* em condições de laboratório.

O vetor

Procedente do Velho Mundo, provavelmente da região etiópica (nordeste da África), o mosquito foi introduzido no Brasil durante o período colonial, provavelmente pelo tráfico negreiro, e se adaptou bem em regiões tropicais. Tem favoritismo por recipientes artificiais com água, abandonados pelo homem, tais como pneus, latas, vidros, cacos, garrafas, pratos de vasos, caixas d'água, piscinas (não tratadas), mas também se reproduz em ambientes naturais

como bromélias, buracos em árvores, escavação em rocha e bambu. As fêmeas limitam seus hábitos hematófagos aos horários diurnos, com picos ao amanhecer e pouco antes do crepúsculo vespertino, mas nada impede que a fêmea altere seu comportamento caso não haja oferta de alimentação necessária para ela.²⁻⁴

O ciclo de vida do mosquito se baseia na oviposição da fêmea em recipiente com água parada, posteriormente, esses ovos eclodem (2 a 3 dias) dando origem à larva (que possui quatro estádios – L1, L2, L3, L4 – e 5 a 7 dias), originando a pupa (2 a 3 dias) e mosquito adulto.⁵

Ovos

Inicialmente são de cor branca no momento da oviposição, tornando-se escuros após alguns minutos devido ao contato com o oxigênio, e conferindo proteção mecânica e contra a perda excessiva de água, não ultrapassam 1mm de comprimento, com formato elíptico, convexo.^{2,6} Após o desenvolvimento embrionário, o ovo entra em diapausa quando não está em contato com água, podendo permanecer viável por vários meses, resistindo à dessecação.⁷

Larvas

Em condições naturais as larvas do *Aedes aegypti* se desenvolvem em água não poluída, com temperatura ao redor de 27°C a $\pm 2^\circ\text{C}$ e pH neutro. As larvas são alongadas e

vermiformes, seu corpo é dividido em cabeça, tórax e abdômen, sendo que a primeira parte é globosa e a última é alongada e constituída de oito segmentos.^{2,8} O oitavo segmento posterior e anal do abdômen possui quatro brânquias lobuladas para a regulação osmótica e um sifão para a respiração na superfície da água. A larva possui quatro estádios, chamados de L1, L2, L3, L4 com duração de aproximadamente 5 a 7 dias. A passagem de um estádio para o outro ocorre pelo processo de “muda”, na qual ocorre o desprendimento do exoesqueleto.^{2,8}

Pupa

É a fase onde ocorre a metamorfose da larva de quarto estádio, no qual entra na fase pupal e durante essa fase ela não se alimenta. Elas possuem um aspecto de vírgula e se locomovem com muita facilidade, porém passam a maior parte do tempo imóveis.² A temperatura ideal para essa fase é de 27°C a ± 2°C e dura entre 2 a 3 dias.

As pupas são diferenciadas entre macho e fêmea pela diferença considerável em tamanho, tendo a fêmea tamanho significativamente maior que o macho. Nos machos a parte posterior é em forma crescente e com uma curvatura, já nas fêmeas a parte posterior é mais curvada do que no macho e o comprimento do nono segmento é igual ao do oitavo.^{3,9}

Adulto

O mosquito adulto representa a fase reprodutiva, dividido em cabeça, tórax e abdômen. Na cabeça estão os principais órgãos do sentido (olhos, antenas e palpos), já no tórax estão as estruturas responsáveis pela locomoção, ou seja, patas e as asas, o abdômen

inclui a parte dos órgãos reprodutor, digestivo e excretor. O mosquito geralmente é escuro com escamas ornamentais que formam manchas prateadas pelo corpo. O tórax é recoberto por escamas escuras e branco-prateadas, na qual faz um formato de uma “lira”. O abdômen é composto também por escamas formando anéis. Suas pernas são escuras sendo que o fêmur e a tíbia são revestidos por escamas brancas e os artículos tarsais com anéis brancos nas extremidades. Os machos e as fêmeas se alimentam de néctar açucarado e somente as fêmeas são hematófagas (hábito diurno), o sangue se faz necessário como fonte proteica na maturação dos ovos. A cópula entre o macho e a fêmea se dá durante o voo sendo o macho atraído pela fêmea devido às batidas das asas, porém, pode ocorrer em uma superfície horizontal ou vertical. Em média uma fêmea produz 120 ovos por postura, entretanto, segundo Yang et al. (10), em laboratório uma fêmea de *Aedes aegypti* na temperatura de 20 a 30°C em média chega a ovipor de 180 a 280 ovos, com a média de 6 a 8 ovos por dia. Em laboratório os adultos podem permanecer vivos de 30 a 35 dias, mas em geral as fêmeas são mais longevas que os machos. Para diferenciar o macho da fêmea nota-se que o palpo maxilar do macho é igual no comprimento ou maior do que a probóscide e com tufos; já nas fêmeas são curtos e com ausência dos tufos. Também é possível diferenciar pela genitália, pois a fêmea é menos complexa que o macho, que apresenta um aspecto digitiforme ou um pouco pontiagudo, com presença de cercas.^{2,8,9}

Insetário

Um insetário para criação de *Aedes aegypti* constitui-se de um laboratório onde são mantidos os insetos vivos, em condições ideais

para a espécie e sob critérios de segurança para a sua manipulação, sem oferecer riscos à comunidade em que se insere.^{10,11}

Segundo Gerberg EJ¹¹ e Adegas MG¹⁰ recomenda-se na entrada do insetário a identificação do nível biossegurança e do microrganismo, que, neste caso, será o Nível de risco de Biossegurança II. O insetário deverá ser separado de passagens públicas e de preferência por um sistema de porta dupla, que deverão permanecer fechadas, por sistema mecânico, separado por antecâmara, com fechamento interdependente, automático, separando o restante do laboratório (evitando o risco de fuga de insetos), com visores de acesso único e restrito às pessoas que fazem parte da manutenção das colônias e pesquisadores envolvidos. Caso haja janelas, elas deverão ser em vidro fixo e teladas com malha inferior a 1 mm, evitando fuga de insetos. As paredes, teto e chão deverão ser lisos, de fácil limpeza e sem juntas, de cores claras (preferencialmente brancas), com pé direito baixo. O mobiliário deverá ser o mínimo possível e afastado das paredes, com bases protegidas contra acesso de formigas e outros insetos, de fácil limpeza, com bancadas resistentes a limpeza e com condições de conforto necessárias. Recomenda-se na antecâmara a instalação de cesto ou armário fechado, em cor clara, para descarte ou guarda de jalecos descartáveis ou reutilizáveis, e deverá ser instalada uma cortina de ar na parte superior interna de uma das portas (a que liga com o ambiente externo), que seja acionada automaticamente, tão logo a porta seja aberta. É necessário um sistema de emergência para energia elétrica, os dutos de fiação deverão ser acessíveis para a manutenção, embutidos na parede. O insetário deverá ter iluminação de emergência caso haja falta de luz. A ventilação

deverá ser feita por um sistema de climatização próprio, telado, controlado e adequado ao conforto ambiental. Existe a necessidade de pia, provida de válvula de fechamento, para anteder ao fluxo de trabalho com as colônias e uma pia próxima da saída, para facilitar a higienização.

Em relação à equipe que irá trabalhar no insetário, recomenda-se treinamento adequado antes do início de qualquer atividade, manter cópia de procedimentos de trabalho no laboratório e de procedimentos para situações de emergência no insetário em caso de acidentes, sendo que se deve considerar todo material biológico como potencialmente prejudicial. A equipe deverá usar luvas e, antes de descartá-las, estas deverão ser higienizadas. Recomenda-se lavar as mãos após o uso das luvas e antes de sair do insetário. É ideal o uso de jalecos no insetário, e se possível descartáveis, retirados na antecâmara, após inspeção rigorosa, uma vez que é comum que insetos fiquem pousados nas roupas. Recomenda-se ainda nunca recapear ou dobrar agulhas; pipetar com a boca; comer, beber ou fumar; estocar objetos privativos e materiais no insetário; tocar no rosto com a luva; mastigar lápis ou caneta; retirar lápis ou caneta do insetário; tocar em maçanetas ou interruptores com luvas. O insetário deverá conter apenas material em uso e o material cirúrgico deverá ser mantido na sala de apoio para manipulação.^{10,11}

As visitas para a manutenção de equipamentos necessitam obrigatoriamente de acompanhamento por pessoa do laboratório.^{10,11}

A limpeza do insetário deverá ser feita por produtos químicos que não comprometam a colônia, uma vez que ela pode ser sensível a odores. Neste caso, é recomendável que qualquer procedimento que envolva riscos potenciais de contaminação seja realizado na sala de apoio

ao insetário. A limpeza dos equipamentos ou materiais deverá ser feita em áreas próximas ao insetário, de acordo com recomendações específicas da espécie. O alimentador artificial deverá ser autoclavado ou quimicamente desinfetado periodicamente. Todo o material biológico utilizado no insetário deverá ser descontaminado por meio de congelamento ou imersão em água quente ou água sanitária. A eliminação de insetos adultos se faz por autoclavação, aquecimento em estufas a 70°C ou congelamento a -20°C por 18 horas.^{10,11}

A temperatura e a umidade do insetário são fatores de grande importância para uma criação bem-sucedida. O método mais adequado de fornecer calor para a criação de larvas é através do uso de mantas térmicas sobre as prateleiras, ajustadas à temperatura de 26°C, e para o mosquito adulto é através de climatizador de ambiente ajustado para 27°C, sendo esperada uma oscilação de temperatura de cerca de dois graus para mais ou para menos. A umidade relativa do ar deve ser controlada através de umidificador de ambiente, programado para 75% U.R. As condições ambientais devem ser controladas com termo higrômetro, “*datalogger*” para a gravação do registro permanente e um termômetro de mercúrio sobre água exposta na manta térmica. Os dados obtidos devem ser analisados para ajustes de programação dos equipamentos.¹⁰

A iluminação pode afetar diretamente no desenvolvimento das diversas fases do ciclo do mosquito.¹¹ No insetário um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão permite a melhor e mais uniforme criação do mosquito, sendo feito sem atrapalhar o horário normal de trabalho dos funcionários. Para isto, é utilizado um timer de controle de foto período, programado para as luzes desligarem às 18

horas e ligarem às 6 horas. É indicado o uso de lâmpadas fluorescentes, pois elas são as que mais se assemelham à luz do dia.^{11,10}

Formação de colônia

A partir de ovos provenientes de coletas em campo, em armadilhas de oviposição, estabelece-se uma colônia da população de origem, em laboratório. Comumente, utilizam-se palhetas do tipo Eucatex, de formato retangular (12x2cm), como substrato para oviposição (feno a 10%). Importante ressaltar que a coleta em campo deve ter amostragem significativa da área geográfica de origem e estar em consonância com o objetivo da utilização das colônias.

Após o recebimento de palhetas do campo, estas são analisadas em lupa entomológica para verificar a presença de ovos. Caso sejam positivas, os ovos são contados e as palhetas inicialmente acondicionadas em caixas multiuso de 10 litros, transparentes, sobrepondo as palhetas umas a outras de modo entremeadado, com tiras de papelão ou palito de sorvete a fim de evitar contato e também para conservar os ovos. Deve-se colocar dentro da caixa um copo de 50 ml com água para manter a umidade.

Uma vez finalizada a amostragem, dá-se início a formação da colônia, pela eclosão de ovos. Para propiciar a eclosão, as palhetas devem ser acondicionadas em bacias plásticas de modo a preencher o fundo do recipiente, viradas com a parte lisa para baixo e a parte rugosa, onde estão os ovos, para cima. Deve-se observar a quantidade de palhetas para não haver sobreposição que possa prejudicar a eclosão. Utilizam-se tantas bacias quantas forem necessárias para o perfeito acondicionamento das palhetas (Figura 1).^{12,10}

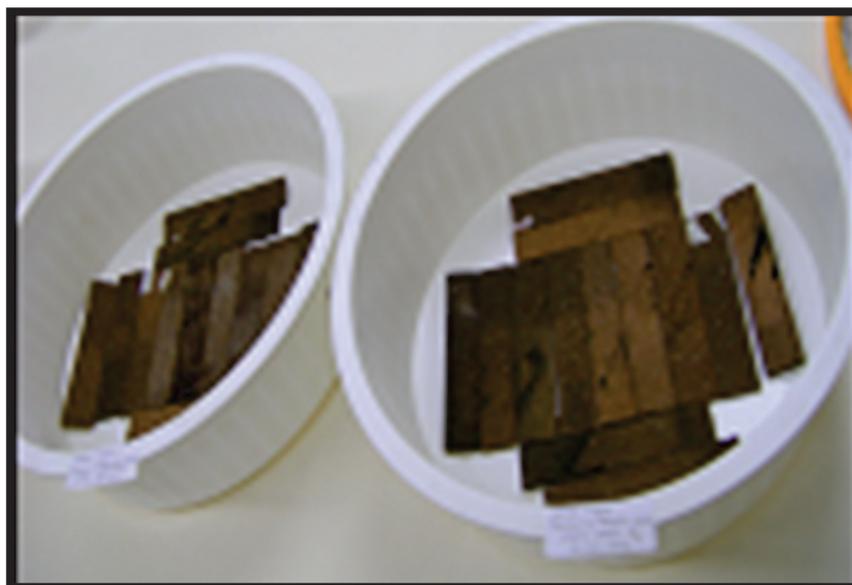


Figura 1. Bacias de plástico com palhetas de Eucatex

As bacias devem ser preenchidas com água até a metade da capacidade e adicionado fermento biológico seco granulado, conforme a proporção abaixo:

Tabela 1. Proporção de água e fermento

Ovos	Água	Fermento
100	200 ml	20 mg
100 – 500	1 litro	100 mg
500 – 1.500	2 litros	200 mg

O fermento biológico atua consumindo oxigênio da água e isto é um estímulo à eclosão dos ovos.¹³

As bacias com palhetas devem ser mantidas sob temperatura de 26°C. Após 24 horas, verifica-se a eclosão das larvas e transferem-se as mesmas cuidadosamente para uma bacia de ágata com auxílio de pipeta plástica. Para padronização do crescimento das larvas, preferencialmente acondiciona-se até 1.000 larvas por bacia de ágata. Deve-se repetir esse procedimento todos os dias subsequentes, transferindo as larvas da bacia com palhetas

para outra bacia de metal e identificando-as com a data do dia que organizaram as das palhetas até no máximo uma semana.¹⁰⁻¹⁵

As larvas devem ser mantidas com alimentação oferecida por ração, com a composição descrita na Tabela 2 abaixo. Diariamente, troca-se a água, retirando a sujidade superficial gerada pelas palhetas, e repondo segundo o volume proporcional a quantidade de ovos e fermento. Após o período de uma semana, as palhetas devem ser encaminhadas para incineração.^{8,16}

Tabela 2. Composição da ração para alimentação de larvas

Componente	Quantidade	
Proteína	44%	44g/kg
Extrato Etéreo	11%	110g/kg
Fibra	2%	20g/kg
Umidade	8%	80g/kg
Matéria Mineral	9%	90g/kg
Cálcio	2%	20g/kg
Fósforo	1,4%	14g/kg
Vitamina C	*	100mg/kg
Ácidos Graxos Ômega-3	*	9.000mg/kg

Conforme as larvas tornam-se pupa, devem ser retiradas da bacia e transferidas para um copo e, em seguida, colocadas em gaiolas pequenas (30x25x25cm) onde ocorrerá a emergência dos mosquitos adultos. Junto do copo na gaiola é oferecida alimentação energética em algodão estéril embebido em solução de mel a 10%. Utiliza-se absorvente interno de algodão por sua característica de esterilidade, o que permite a boa manutenção da colônia e uma demora maior para proliferação de fungos do que o obtido com algodão comum.^{17,18}

Triagem de *Aedes aegypti*

Pelo tipo de armadilha de origem dos ovos há possibilidade de que os ovos sejam de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* e há, portanto, a necessidade de se triar os exemplares adultos que emergirem das pupas para posterior composição da colônia. Após a emergência dos mosquitos adultos, estes devem ser aspirados com um capturador elétrico (Figura 2), em grupos de 3 a 5 mosquitos, identificando-se os espécimes de *Aedes aegypti* pelo desenho da Lira no mesonoto do inseto.^{15,19}

Transfere-se para uma gaiola maior (40x40x40cm) todos os espécimes de *Aedes aegypti* triados e contados, totalizando uma massa volumétrica de 0,65 mosquitos/m². Para esta densidade, o número ideal para formação da colônia é 500 fêmeas e 500 machos. A quantidade mínima deverá ser 300 de cada, não existindo limite máximo.¹¹ Os espécimes que não condizerem com a identificação são expirados com o capturador elétrico para dentro do copo de plástico, com válvula elástica e controle de abertura, para posterior descarte.^{8,20}

Deve-se manter disponibilizado na gaiola a fonte de alimentação energética – algodão

embebido com solução de mel a 10% (10 ml de mel diluído em 100ml de água deionizada).



Figura. 2. Capturador elétrico para captura de alados

Colônia de *Aedes aegypti*

Após a triagem, o fornecimento de alimentação energética é contínuo – solução de mel a 10%. Diariamente, as gaiolas são limpas com gaze úmida e seca, retirando os mosquitos mortos e diariamente o repasto sanguíneo através de alimentação artificial é fornecido, da seguinte forma:

Alimentação com fonte de sangue:

Para cada gaiola serão necessários:

- Copo descartável de 200 ml;
- Círculo de tecido artificial (TNT) de 15 cm de diâmetro;
- 20 cm de barbante;
- Elástico de látex;
- Água aquecida a 40°C;
- Sangue bovino heparinizado.

Procedimento

Na extremidade do copo descartável, insere-se um barbante de 20 cm formando uma “alça”, como ilustrado na Figura III. Na base do copo, preenche-se a depressão do copo com sangue de boi heparinizado. Cobre-se a base com o tecido TNT, fixado com um elástico de látex. Inverte-se o copo de modo a deixar o sangue para baixo e completa-se a metade do copo com a água aquecida a 40°C. Deve-se disponibilizar o copo pendurando-o na gaiola durante 30 minutos. Após este período, completa-se a água novamente aquecida de modo que a fonte sanguínea permaneça dentro da gaiola, à disposição das fêmeas pelo período de 60 minutos, ainda em condição de temperatura adequada ao repasto. O período ideal de permanência do repasto sanguíneo deve ser entre 11h e 13h, que é o horário de atividade das fêmeas. Recomenda-se a retirada da alimentação com algumas horas de antecedência para que as fêmeas do mosquito necessitem se alimentar.^{12,16-17}

Após dois a três dias do primeiro repasto sanguíneo, período do ciclo gonotrófico,²¹ coloca-se um copo âmbar com água contendo

fitas de papel filtro que servirá de substrato para oviposição. O copo deve ser protegido com suporte preto vazado para controle de luminosidade, para fornecer conforto ambiental. Após um dia, remove-se o copo âmbar da gaiola, mantendo disponibilidade de alimentação energética. Transfere-se os copos com fitas para a caixa plástica multiuso aberta, que deve ser protegida com tela, para embrionamento dos ovos.¹⁷



Figura 3. Copo descartável com alça de barbante a ser utilizado no repasto sanguíneo de fêmeas de *Aedes aegypti*



Figura 4. Montagem dos copos.



Figura 5. Disponibilização do copo com sangue dentro da gaiola com água a 40°C.

Após 24 horas, retira-se as fitas do copo, transferindo-as para bandejas, para que sequem com a parte contendo ovos para cima. Após a secagem, conta-se o número de ovos com contador de células. Estes ovos serão a primeira geração obtida em laboratório, ou geração F1. As fitas de ovos são guardadas em envelopes de papel sulfite ou similar, identificando na parte externa a data, o responsável pela contagem e o número de ovos. Caso a postura da colônia decresça e ainda se necessite obter ovos, pode-se formar uma segunda geração a partir dos ovos da primeira. O

procedimento é semelhante ao anteriormente descrito, porém, sem a necessidade de triagem de espécie. Os ovos originários serão de segunda geração, ou F2.

Criação de larvas e adultos para teste

Há vários ensaios biológicos que utilizam larvas ou formas adultas de *Aedes aegypti*. Em ensaios para susceptibilidade, efetividade de produtos ou equipamentos, é importante que os exemplares testados tenham idade e status nutricional controlados, o que permite a comparabilidade dos resultados.^{16,19}

Para obtenção de larvas ou fêmeas a serem utilizadas em ensaios, trabalha-se com geração F1 ou F2.

Assim como na formação de colônias, na criação de larvas para teste deve-se diariamente verificar a temperatura do termômetro imerso em água dentro de uma bacia de plástico e observar também a temperatura do termostato da sala em que se encontram as bacias para a criação de larvas. É importante que sempre se observe se houve mortalidade de pupas e larvas ao fazer a troca da água da bacia.^{16,18,19}

Deve-se retirar toda a sujeira superficial contendo exúvias, escorrendo devagar pelas bordas da bacia de metal a água do meio de criação, de modo que as larvas fiquem sob um pequeno volume, evitando dano a elas. Deve-se repor cuidadosamente o volume através de proveta graduada até o volume e quantia de ração (Tabela 3 e 4), indicado baixo.

Tabela 3. Quantidade de ração por larvas em estágio de L1 a L2

Larvas	Quantidade de água	Ração/quantidade no cachimbo
Até 500 larvas	1 litro	½ medida da ração
De 500 a 1000 larvas	2,5 litros	1 medida de ração*

*aproximadamente 200mg

Tabela 4. Quantidade de ração por larvas em estágio L3 a L4

Larvas em estágio L3	Quantidade de água	Ração/quantidade no cachimbo
300 a 500 L3	1 litro	½ medida da ração
750 L3	2,25 litros	1 medida de ração
1.000 L3	2,5 litros	1 medida de ração

**L3 – ocorre mudança de estágio cerca de três a quatro dias após a eclosão dos ovos

Cobre-se a bacia de metal com um tule preto e acondiciona-se em manta térmica calibrada para obtenção de temperatura na água em 26°C. O ajuste de temperatura da água depende da temperatura ambiente e, portanto, deve ser monitorado. A alimentação deve ser repetida sempre que necessário, enquanto houver larvas, com cuidado, respeitando a quantidade de ração ofertada. Esse procedimento é feito até que se atinja o estágio larvário necessário para o teste que se realizará.

Para que se crie a forma adulta do mosquito executa-se o mesmo procedimento para criação de larvas com continuidade de reposição de alimento, até a formação de pupas. A partir disto, as pupas formadas devem ser retiradas das bacias com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Nesta etapa, processa-se a sexagem das pupas, uma vez que os ensaios biológicos devem ser realizados apenas com fêmeas. Os machos são descartados ou usados como controle para avaliação de limpeza de materiais de teste, ou como mostruários. As pupas fêmeas devem ser transferidas para um copo âmbar preenchido com água até a metade e identificado com dados de data, origem e número de pupas,

anotados em etiqueta. Este copo âmbar deve ser colocado dentro de uma gaiola por cerca de 2 a 3 dias, visando à emergência dos adultos seja satisfatória e em local seguro. As fêmeas emergidas recebem alimentação energética por meio de um absorvente interno embebido com solução de mel a 10%.^{8,14,16} Deste modo, as fêmeas para testes terão idade controlada e condições de sobrevivência.

Viabilidade

Os ovos assim armazenados possuem viabilidade média de 3 meses após postura. Tal viabilidade é checada por meio de testes que consistem em fracionar uma fita de ovos em quantidades semelhantes e colocá-las para eclodir em data semelhante, a fim de se saber o tempo de viabilidade.

Após a eclosão, conta-se a quantidade de larvas de terceiro estágio e calcula-se a porcentagem de emergência, de acordo com a quantidade de ovos que foram colocados.

A emergência ideal está em torno de 70% e, caso esteja abaixo de 50%, as fitas são descartadas para incineração.²²

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Glasser CM, Gomes ADC. Infestação do Estado de São Paulo por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Rev. saúde pública. 2000; 34(6):570-7.
2. Consoli R, Oliveira R. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1994.

3. Marques GRAM, Serpa LLN, Brito M. *Aedes aegypti* [internet]. [acesso em: 13/12/2016]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-dengue/den_vetore.pdf
4. Braga IA, Valle D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. 2007. p. 113-8.
5. Christophers S. The yellow fever mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge: The University Press; 1960.
6. Instituto Oswaldo Cruz. Dengue: vírus e vetor [internet]. [acesso em: 21/10/2016]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/opportunista.html>
7. Moraes de Alencar CH. Infestação pelo *Aedes albopictus* (skuse), em criadouros naturais e artificiais encontrados em áreas verdes na cidade de Fortaleza-Ceará [internet]. 2008. [acesso em: 13/12/2016]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/sucen/homepage/downloads/arquivos-dengue/den_vetore.pdf
8. Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Edusp; 1962.
9. Vargas VM. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Linn.). Mosquito News. 1968; 28(3):374-9.
10. Forattini OP. Entomologia Médica. São Paulo: Edusp; 1962.
11. Vargas VM. Sexual dimorphism of larvae and pupae of *Aedes aegypti* (Linn.). Mosquito News. 1968; 28(3):374-9.
12. Adegas MG, Barroso-Krause C, Lima JBP, Valle D. Parâmetros de Biossegurança para Insetários e Infectórios de Vetores: aplicação e adaptação das normas gerais para laboratórios definidas pela Comissão Técnica de Biossegurança da Fiocruz. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2005.
13. Gerberg EJ, Barnard DR, Ward RA. Manual for mosquito rearing and experimental techniques. American Mosquito Control Association; 1994.
14. Macoris MLG, Munerato NOS, Otrera VCG. Elaboração do procedimento operacional padrão para os procedimentos da sala de eclosão, para o Laboratório de Entomologia Aplicada da Superintendência de Controle de Endemias. Marília: SUCEN; 2014.
15. Silva HHG, Lira KS. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. Rev. patol. trop. 1998; 27(1).
16. Macoris MLG, Anjolette AFF, Munerato NOS, Otrera VCG. Elaboração do procedimento operacional padrão para eclosão de ovos de *Aedes aegypti*, para o Laboratório de Entomologia Aplicada da Superintendência de Controle de Endemias. Marília: SUCEN; 2014.
17. Macoris MLG, Munerato NOS, Otrera VCG. Elaboração do procedimento operacional padrão para a formação de colônias de *Aedes aegypti*, para o laboratório de Entomologia Aplicada da Superintendência de Controle de Endemias. Marília: SUCEN; 2014.
18. Macoris MLG, Munerato NOS, Nalom KCR, Santiago TN. Elaboração do procedimento operacional padrão para a manutenção de larvas e pupas para formação de colônias de *Aedes aegypti*, para o Laboratório de Entomologia Aplicada da Superintendência de Controle de Endemias. Marília: SUCEN; 2014.
19. Macoris MLG, Menezes EASS, Munerato NOS, Otrera VCG. Elaboração do procedimento operacional padrão para os Procedimentos da sala de Adulto para o Laboratório de Entomologia Aplicada da Superintendência de Controle de Endemias. Marília: SUCEN; 2014.

20. Macoris MLG, Munerato NOS. Elaboração do procedimento operacional padrão para Recebimentos de palhetas para formação de colônia de *Aedes aegypti*. Marília: Superintendência de Controle de Endemias; 2013.
21. Fundação Nacional de Saúde. Dengue, instruções para pessoal de combate ao vetor. Manual de normas técnicas. Brasília; 2001.
22. Segura MNO, Castro FC. Altas de culicídeos na Amazônia brasileira: características específicas de insetos hematófagos da família Culicidae. Instituto Evandro Chagas; 2007.
23. Oliva LO. Distribuição dos ovos em *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae): efeito da idade da fêmea, posturas prévias e tipo de criadouro. 2011.
24. Maximino TM, Anjolette AFF, Munerato NOS, Macoris MLG. Elaboração de Procedimento Operacional Padrão para controle da viabilidade de colônia. POP. Marília: Superintendência de Controle de Endemias; 2014.
25. Yang HM, Macoris MLG, Galvani KC, Andrighetti MTM, Wanderley DMV. Assessing the effects of temperature on the population of *Aedes aegypti*, the vector of dengue. *Epidemiol. infect.* 2009; 137(8):1188-202.

Correspondência/Correspondence to:

Maria de Lourdes da Graça Macoris - macoris@sucen.sp.gov.br
Superintendência de Controle de Endemias - Marília
Av. Santo Antônio, 1627, Barbosa, Marília - SP, 17506-040
Telefone: (14) 3433-1080