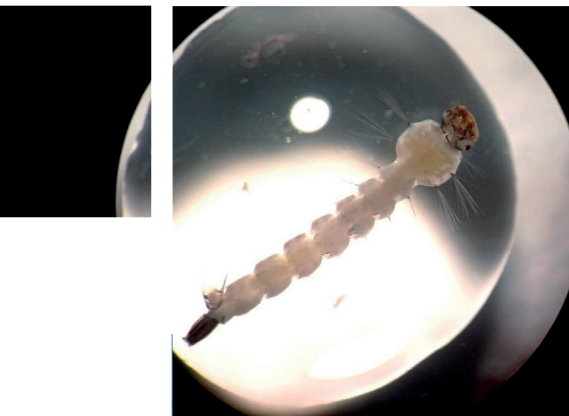


Manual para criação dos dípteros de importância médico veterinário: *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

DOCUMENTOS 379

Manual para criação dos dípteros de importância médico veterinária: *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*

*Stefany Alves Costa
Polyana da Nobrega Mendes
Giovana Cidade Gomes
Albert Ramos de Oliveira
Erick Madson Freire Silva
Francisco Guilherme Vergolino Schmidt
Rose Monnerat*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica – PqEB – Av. W5 Norte
Caixa Postal 02372
70770-917, Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
www.embrapa.br/fale-conosco/sac
www.embrapa.br

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Presidente
Wagner Alexandre Lucena

Secretária-Executiva
Daniela Aguiar de Souza

Membros
*Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes, Andrielle
Câmara Amaral Lopes, Bruno Machado Teles Walter;
Marcos Aparecido Gimenes; Solange Carvalho
Barrios Roveri José; Márcio Martinello Sanches;
Edson Junqueira Leite; Débora Pires Paula*

Supervisão editorial
Daniela Aguiar de Souza

Revisão de texto
Jakcelia Costa da Silva

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Cíntia Pereira da Silva

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Cíntia Pereira da Silva

Foto da capa
Francisco Schmidt e Stefany Alves Costa

1ª edição
1ª edição (on-line) - 2021

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Manual para criação dos dípteros de importância médico veterinária: *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* / Stefany Alves Costa... [et al.]. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2021.

20 p. - (Documentos/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 379).

ISSN: 0102 0110

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader (PDF)

Modo de Acesso: World Wide Web

1. Inseto. 2. Técnica. 3. Bioensaio. I. Costa, Stefany Alves. II. Mendes, Polyana da Nobrega. III. Gomes, Giovana Cidade. IV. Oliveira, Albert Ramos de. V. Silva, Erick Madson Freire. VI. Schmidt, Francisco Guilherme Vergolino. VII. Rose Monnerat. VIII. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. V. Série.

632.7 – CDD 21

© Embrapa, 2021

Autores

Stefany Alves Costa

Bióloga, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Polyana da Nobrega Mendes

Bióloga, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Giovana Cidade Gomes

Bióloga, colaboradora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Albert Ramos de Oliveira

Biólogo, colaborador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Erick Madson Freire Silva

Biólogo, colaborador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Francisco Guilherme Vergolino Schmidt

Engenheiro Agrônomo, MsC em Entomologia, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Rose Monnerat

Bióloga, PhD em Patologia de Invertebrados, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Apresentação

A ordem Diptera, representada por insetos conhecidos como mosquitos e moscas, desempenham importantes papéis na natureza, ora como predadores e parasitoides de pragas, ora como polinizadores ou como alimento para seus inimigos naturais. Porém, é como transmissor de diversas doenças que estes insetos afetam diretamente o ser humano.

Diversas espécies de dípteros da família Culicidae estão envolvidos na transmissão de doenças, nas mais diversas regiões do planeta, sendo a região neotropical aquela onde o ser humano é mais afetado. Dois importantes culicídeos se destacam nesta região: *C. quinquefasciatus* e *A. aegypti*, por transmitirem nesta vasta região doenças tais como filaríosis, dengue, chicungunha, febre amarela e vírus Zica.

O controle desses importantes vetores, normalmente é feito pulverizando-se com inseticidas químicos ou biológico, as áreas onde as larvas destes insetos se desenvolvem, e inseticidas químicos, nas localidades com infestação de mosquitos adultos.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em parceria com a iniciativa privada, vem desenvolvendo inseticidas biológicos, à base de *Bacillus sphaericus* e *B. thuringiensis*, visando ao combate destes vetores ainda na fase larval.

O desenvolvimento desses inseticidas biológicos depende de insetos criados em laboratório, visando garantir a sanidade dos mesmos, na realização dos testes de patogenicidade das bactérias testadas. O manual apresenta o processo de criação dos insetos, incluindo o manejo de ovos, larvas, pupas e adultos, de forma segura e com a qualidade necessária.

Maria Cleria Valadares Inglis

Chefe-Geral da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Sumário

1. Introdução	6
2. Objetivo	7
3. Estrutura física e equipamentos necessários à criação de <i>Culex quinquefasciatus</i> e <i>Aedes aegypti</i>	7
3.1 Estrutura física	7
3.2 Equipamentos, utensílios e insumos	8
4. Criação de insetos	9
4.1 Obtenção de insetos para estabelecimento e revigoramento de colônias	9
4.2 Manutenção das colônias	10
4.2.1 Coleta de ovos	10
4.2.2 Manejo de ovos e de larvas de <i>A. aegypti</i> . e <i>C. quinquefasciatus</i>	11
4.2.3 Manejo de pupas de <i>A. aegypti</i> . e <i>C. quinquefasciatus</i>	13
4.2.4 Manejo de adultos de <i>A. aegypti</i> . e <i>C. quinquefasciatus</i>	13
5. Referências	16
Anexo I	18
Anexo II	19

1. Introdução

Entre os animais, a classe insecta é a que possui o maior número de espécies, tendo aproximadamente um milhão de espécies descritas, que interagem harmônica ou desarmonicamente com outros organismos, incluindo o homem (Gullan; Cranston, 2005; Speight et al., 2008).

Pela afinidade com o homem e seu ambiente, várias ordens de insetos podem estar envolvidas direta ou indiretamente com a origem e/ou causa de doenças. Tem importância destacada Blattaria (baratas), Phthiraptera (piochos), Hemiptera (barbeiros e percevejos), Coleoptera (besouros), Siphonaptera (pulgas), Lepidoptera (mariposas e borboletas), Hymenoptera (abelhas, vespas e formigas) e Diptera (moscas e mosquitos), (Grella, 2011). Dentre os artrópodes a Ordem Díptera, representada por cerca de 150.000 espécies descritas (Tissot; Silva, 2008), contém a maioria das espécies transmissoras de patógenos ao ser humano ou lhe causam outros tipos de problemas de saúde (Coetzee, 2014). Das 106 famílias pertencentes à ordem Díptera somente 10 são de importância médica, e destas, relativamente poucas espécies estão envolvidas na transmissão de doenças (Coetzee, 2014).

Os mosquitos da família Culicidae são amplamente reconhecidos como os mais importantes dípteros envolvidos na transmissão da Malária e Filariose, bem como dos vírus da Chycuncunha, Zica e Dengue na região Afrotropical e Neotropical (Coetzee, 2014), infectando mais de 120 milhões de pessoas com filariose linfática em 73 países, desfigurando ou incapacitando cerca de 40 milhões de pessoas com a doença (WHO, 2015). No Brasil a Filariose restringe-se endemicamente ao estado de Pernambuco e, desde 2013, não foram diagnosticados casos novos (Brasil, 2017).

As larvas dos mosquitos utilizam, para se desenvolverem, o ambiente modificado pelo homem quando isto disponibiliza água para o seu crescimento, e os adultos se alimentam do sangue de animais e aves que vivem próximos aos seres humanos, mas é ao se alimentar destes últimos que obtém o seu melhor desempenho reprodutivo (Pina; Fonseca, 1999).

As espécies transmissoras de doenças afetam os seres humanos bem como os animais criados por estes, chegando muitas vezes a causar severos prejuízos econômicos e de ordem sanitária, (Grella, 2011).

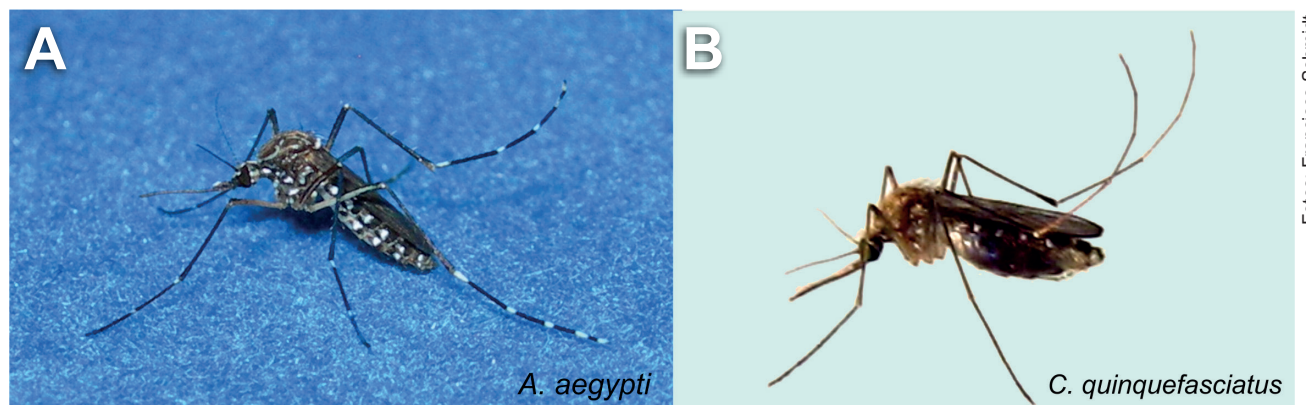
Culex quinquefasciatus e *Aedes aegypti* (figura 1) são insetos hematófagos, presentes em todo o território Brasileiro, de grande importância epidemiológica por serem vetores de diversas doenças virais e parasitárias. No Brasil *A. aegypti* é o transmissor dos vírus da dengue, da febre amarela urbana, da Zica, da febre Chikungunya e *C. quinquefasciatus* das Filarioses, tais como a elefantíase (Pontes et al., 2020).

Até o momento não existem métodos profiláticos eficientes, como vacinas para prevenir várias das doenças transmitidas por estes mosquitos, e nem mesmo os medicamentos utilizados nos tratamentos apresentam grande eficiência, e muitas dessas doenças como Malária, Zica e outras são responsáveis por alto índice de mortes, principalmente no Norte do país e nos países pobres da África e Ásia (referência). Dessa forma, é importante desenvolver métodos de controle desses vetores, visando a interrupção da transmissão. Para isso é necessário ter uma criação de insetos vetores de forma a tê-los saudáveis e em condições totalmente controladas.

Nesse sentido a Plataforma de Criação de Insetos – PCPI da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, possui uma população de *A. aegypti* e de *C. quinquefasciatus* para fornecimento de insetos de excelência, em ambiente controlado, buscando sempre uma padronização da qualidade

dos mosquitos, permitindo assim uma melhor comparação entre os resultados dos ensaios que utilizam esses insetos (Anderson; Leppla, 1992; Sing, 1977; Singh; Moore, 1985).

As metodologias aqui apresentadas têm produzido mosquitos e permitido a pesquisa e desenvolvimento de bioinseticidas, à base de *Bacillus*, para o controle desses vetores desde 1987. A criação destes insetos evoluiu para a não utilização de cobaias doadoras de sangue, migrando para a utilização de dietas cada vez mais sintéticas atendendo às determinações da Associação Veterinária Mundial (WVA) e Institutos de Proteção Animal (Gonzales et al., 2018) que visam o bem-estar dos animais e a aplicação da ética na utilização dos mesmos.



Fotos: Francisco Schmidt.

Figura 1. Insetos adultos A) *Aedes aegypti* e B) *C. quinquefasciatus*.

2. Objetivo

Este manual visa orientar pesquisadores e técnicos quanto à produção e controle de qualidade de populações de *A. aegypti* e de *C. quinquefasciatus* para a criação em laboratório, gerando ovos, larvas e adultos de qualidade que possam ser utilizados em ensaios para testes de patógenos, semioquímicos, inseticidas e outros visando a obtenção de novos produtos para seu controle.

Os propágulos infectivos de fungos que parasitam os ovos de nematoides apresentam um processo de infecção similar ao dos fungos entomopatogênicos. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de que esses fungos saprófitas consigam sobreviver por longos períodos após incorporados ao solo, e que as hifas produzidas nesse habitat sejam, em muitos casos, os principais propágulos responsáveis pela infecção de nematoides suscetíveis. Na realidade, há uma acentuada carência de pesquisas que busquem elucidar vários aspectos ainda obscuros do processo de infecção por fungos nematófagos.

3. Estrutura física e equipamentos necessários à criação de *C. quinquefasciatus* e *A. Aegypti*

Para produzir insetos com qualidade é necessário dispor de estrutura física adequada, equipamentos e insumos de boa qualidade bem como metodologia de produção bem estabelecida.

3.1 Estrutura física

Recomenda-se que a estrutura física de uma unidade de produção de insetos seja composta minimamente por 4 ambientes: (a) Sala de criação e manejo de larvas e adultos, (b) Sala de preparo de dietas, (c) Sala de descarte e limpeza e (d) local para manutenção de codornas.

- a) Sala de criação de insetos (figura 2): este espaço é destinado a manter e efetuar o manejo dos insetos. Deve ser uma sala climatizada com condicionadores de ar do tipo quente/frio para manter a temperatura da sala em torno de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. O controle do fotoperíodo deve ser feito com a instalação de um *timer*, fornecendo 14 de fotofase disponibilizadas por lâmpadas do tipo tubular “luz do dia” instaladas no teto. Esta sala deve ter bancada com pia para limpeza e fornecimento de água para os insetos. Deverá dispor de prateleiras para comportar as bandejas onde os ovos e larvas serão mantidos e também gaiolas para adultos. O tamanho da sala será conforme o tamanho da criação pretendida. Janelas são dispensáveis nesse tipo de criação, entretanto é ideal que se tenha um exaustor, devidamente protegido por tela de malha 14 e com vedação de luz externa por basculante metálico. A manutenção da temperatura e do fotoperíodo indicado são fundamentais para o sucesso e continuidade das colônias de insetos (Cohen, 2018).
- b) Sala de preparo de dietas: este espaço é destinado ao preparo das dietas dos adultos e das larvas. Deverá possuir uma autoclave, balança analítica, agitador magnético e bancadas para manipulação das dietas.
- c) Sala de descarte: esta sala deverá ser separada e deverá conter um reservatório onde todo o material será descartado e posteriormente coletado (Parra, 1986).
- d) Local para manutenção das codornas: este espaço, preferencialmente deverá ser em outra estrutura e seguir as exigências do CEUA para criação de codornas em cativeiro e sua utilização na criação de insetos ou experimentos.

3.2 Equipamentos, utensílios e insumos

Os equipamentos necessários são: ar condicionado quente/frio, *timer* para controle do fotoperíodo, autoclave, geladeira, balança analítica, agitador magnético.



Foto: Albert Oliveira.

Figura 2. Sala de criação e manejo de larvas e adultos.

Serão precisos os seguintes utensílios: balde de 20 litros, bandeja de plástico (60 x 40 cm) com capacidade de 5,5 litros, béquer plástico de 4000 mL, copos de plástico 300 mL e de 50 mL, elásticos, Erlenmeyers de 500 mL, 1.000 mL, filme plástico, gaiolas quadradas com tela mosquiteira, luva cirúrgica papel filtro, papel toalha peneira de metal (marca: Solotest especificações: USBS/60 abertura em mm/0,250 tyler/60), pissetas pipetas Pasteur de 3 mL (descartáveis), potes plásticos de 100 mL, sacos de plástico, vasilha de plástico preto (500 mL), termômetro com amplitude de 0a 50°C, tesoura e tecido tipoTNT (Tecido Não Tecido).

Os insumos necessários são: água filtrada, água filtrada autoclavada, álcool 70% e 92%, fermento biológico seco utilizado em panificação, mel de abelha, ração de manutenção para codornas, ração para gatos castrados.

4. Criação dos insetos

4.1 Obtenção de insetos para estabelecimento e revigoramento de colônias.

Para iniciar uma colônia, os insetos devem ser obtidos preferencialmente de outra criação, garantindo assim que sejam insetos de boa qualidade livres de organismos patogênicos aos seres humanos e aos próprios insetos. Nesse sentido indicamos como possível fornecedor de matrizes os laboratórios da Fundação Oswaldo Cruz. Estes insetos, entretanto, devem obrigatoriamente passar por um período de quarentena para evitar a introdução de microrganismos contaminantes, parasitóides e predadores no local de criação (Schmidt et al., 2001; Anderson; Leppla, 1992).

Na população selvagem introduzida no laboratório é normal ocorrer perda da variabilidade genética devido à “deriva genética”, seleção e “*inbreeding*” (cruzamento entre irmãos), nas primeiras gerações, e somente por volta da quinta geração a variabilidade é recuperada devido à mutações e recombinações (Parra, 1986).

Para o estabelecimento da colônia de *C. quinquefasciatus* são coletadas larvas no campo, em locais como lagoas de oxidação, poças d’água de chuva, águas pluviais encontradas em garagens de edifícios, de preferência onde não tenha sido feito nenhum tipo de controle químico ou biológico recente e onde a Filariosi não seja endêmica. Essas larvas coletadas são deixadas em local isolado e à medida que empupam são colocadas em gaiolas. A quantidade aproximada é de 700 pupas por gaiola. Pode-se ainda proceder à coleta de ovos da seguinte forma:

- a) Colocar potes pretos com 500 mL de água próximo na sombra de árvores ou em locais com incidência dos mosquitos;
- b) Observar uma vez por dia se houve oviposição nos copos e fazer a coleta das “jangadas” com o auxílio de um pincel;
- c) Transferir os ovos coletados para uma bandeja de plástico contendo 2,5 litros de água filtrada, adicionar um grão de ração de gato castrado;
- d) Observar o desenvolvimento das larvas e aguardar o aparecimento de pupas, após isso transferi-las para novas gaiolas de adultos.

Os mesmos procedimentos em laboratório são feitos quando da introdução ou estabelecimento de colônia de *A. aegypti*, exceto em relação à origem. Este inseto deve proceder de outro laboratório, pois doenças transmitidas por ele ao homem passam de uma geração de mosquito à outra, através

dos ovários das fêmeas portadoras (Consoli; Oliveira, 1994). No anexo 1 é apresentado esquema geral para estabelecimento ou revigoração de colônia de insetos.

4.2 Manutenção das colônias

A sala de criação dos mosquitos deve ser mantida numa temperatura de $(28 \pm 4) ^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h.

4.2.1 Coleta de ovos

a) *C. quinquefasciatus*

Os ovos de *C. quinquefasciatus* colocados em grupos de aproximadamente 250 unidades, sendo este agrupamento denominado “jangada” (figura 3). Para obtenção destes, são inseridas dentro das gaiolas de adultos, vasilhas de plástico contendo água.

Os ovos não podem ser armazenados, pois, não resistem à dessecação, sendo necessário colocá-los, imediatamente após a coleta, nas bandejas com água e alimento previamente preparadas. As bandejas de plástico devem ser lavadas com água e detergente neutro, secadas com papel toalha, esterilizadas com álcool 70%, e deixadas sob luz UV, à 40 cm de uma lâmpada tubular de 30W Uv-c, em uma capela de fluxo laminar ou equipamento similar alternativo por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, 2 litros de água filtrada são depositados na bandeja.

É importante não colocar mais do que dez jangadas por bandeja, evitando assim a superpopulação de larvas que retarda o seu desenvolvimento.

b) *Aedes aegypti*

Os ovos de *A. aegypti* são colocados isoladamente em superfície úmida. Assim, para se obter ovos a partir de fêmeas mantidas em gaiolas, deve-se inserir no interior das gaiolas, vasilhas cilíndricas de plástico de cor preta, revestidas com tiras papel filtro, umedecido com água filtrada até a metade da altura do recipiente (figura 4, A). As fêmeas adultas ovipositam sobre os papéis (figura 4, B).

Foto: Francisco Schmidt.

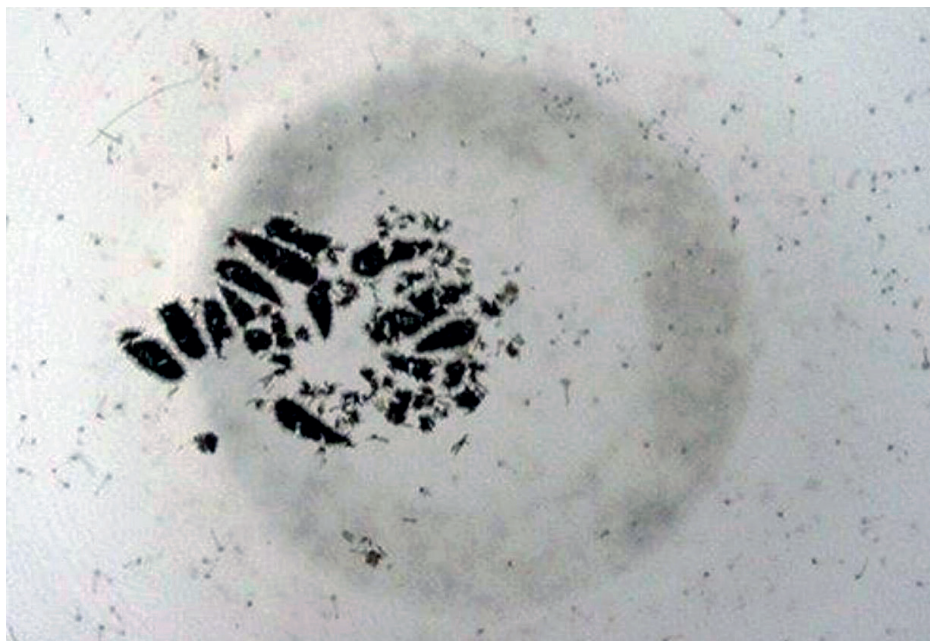


Figura 3. Agrupamento de ovos de *C. quinquefasciatus* “jangada”.

Os ovos devem ser coletados diariamente ou a cada dois dias (segundas, quartas e sextas-feiras), através da retirada do papel depositado nas vasilhas cilíndricas. Esses papéis devem ser colocados para secar à temperatura ambiente e devem ser identificados com o nome da espécie de inseto, a data e geração.

Após a secagem do papel, que ocorre em cerca de três dias, os ovos podem ser armazenados, pois, resistem à dessecação. As tiras contendo os ovos devem ser depositados em sacos de plástico identificados (mês e ano da coleta; figura 4, C) e os mesmos são mantidos dentro de um recipiente fechado e identificado na sala de criação (figura 4, D). Os ovos armazenados, permanecem viáveis por cerca de um ano.

4.2.2 Manejo de ovos e de larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

A eclosão das larvas de ambos insetos ocorre a aproximadamente 24 h após a colocação das jangadas ou ovos em papel filtro nas bandejas com água destilada.

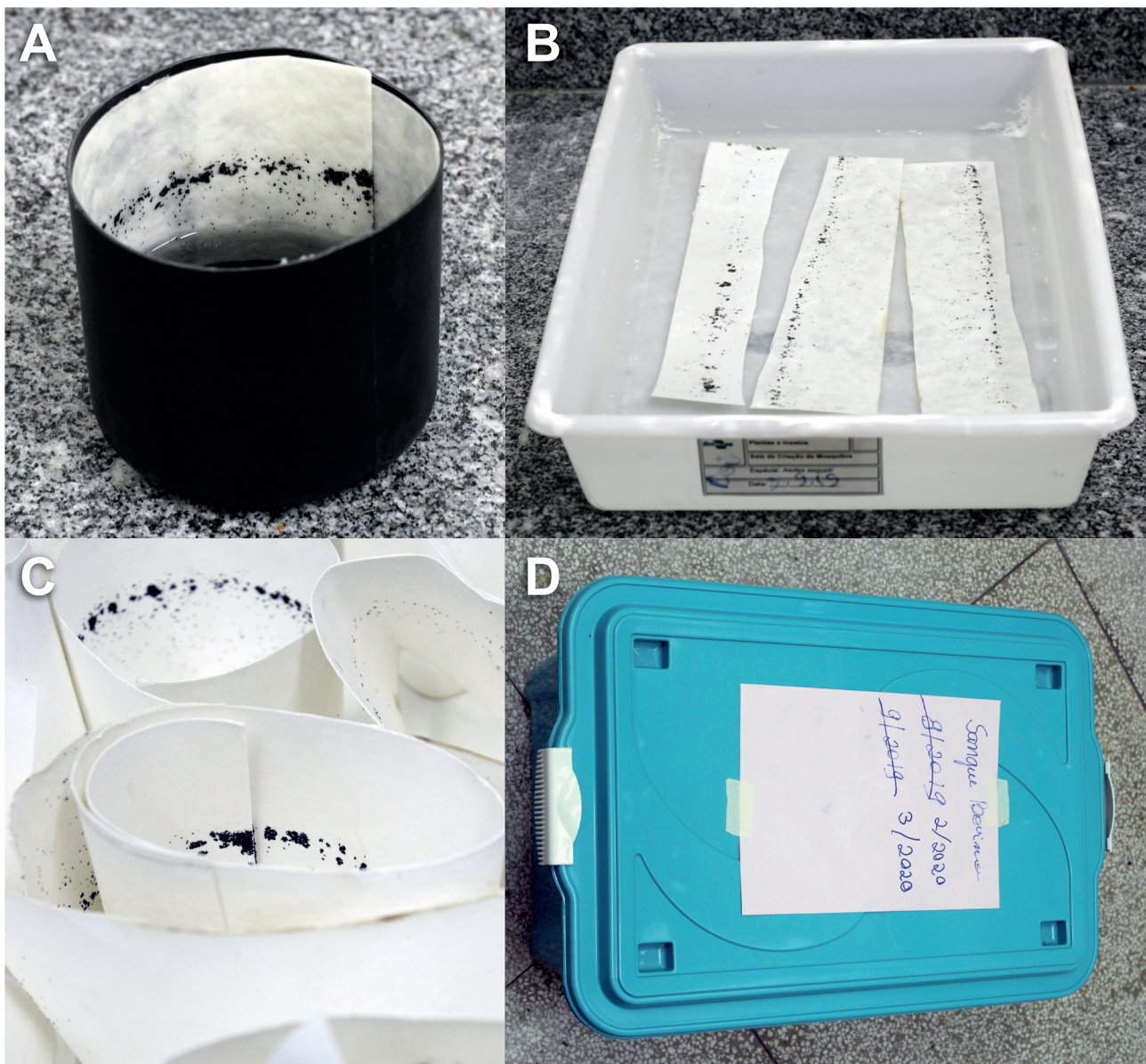


Figura 4. (a) vasilhas cilíndricas de plástico de cor preta, revestidas com tiras papel filtro, umedecido com água filtrada até a metade da altura do recipiente contendo ovos depositados, (b) tiras de papel de filtro colocadas para secar, (c) tiras de papel filtro secas contendo ovos, (d) recipiente fechado para estocar os sacos plásticos.

Para a eclosão dos ovos do *A. aegypti*, deve-se utilizar o papel filtro, com os ovos, mais antigos. Deve-se adicionar 0,3 g de fermento biológico em pó, previamente diluído em 3 litros de água filtrada. O fermento biológico atua consumindo o oxigênio da água, estimulando a eclosão das larvas (Nunes et al., 2020). O papel filtro com os ovos deve permanecer totalmente submerso pela água para haver a eclosão das larvas.

As larvas são alimentadas com ração para gato castrado, previamente autoclavada a 121°C por aproximadamente 20 min (figura 5). Deve ser colocada 1 unidade (cerca de 0,123g) de ração de gato em cada bandeja e a reposição deve ser feita quando não houver mais vestígios de ração nas bandejas.



Figura 5. Ração de gato autoclavada.

A cada dois dias, a água das bandejas deve ser trocada para evitar contaminação. Desta forma, deve-se recolher as larvas em uma peneira com malha de metal (figura 6, A) e com auxílio de uma pisseta, jogar água filtrada sobre a peneira com as larvas (figura 6, B), para elas caírem dentro da nova bandeja preparada de maneira descrita anteriormente para ovos (figura 6, C).

É importante não colocar comida em excesso nas bandejas, pois, a ração para gato pode fermentar, formando uma nata que impede a respiração das larvas.

Esta manipulação é realizada por cerca de sete dias até que a larva atinja o estágio de pupa.



Figura 6. procedimento para a troca da água das larvas, (A) larvas são depositadas em peneiradas, (B) com auxílio de uma pisseta são depositadas em nova bandeja (C).

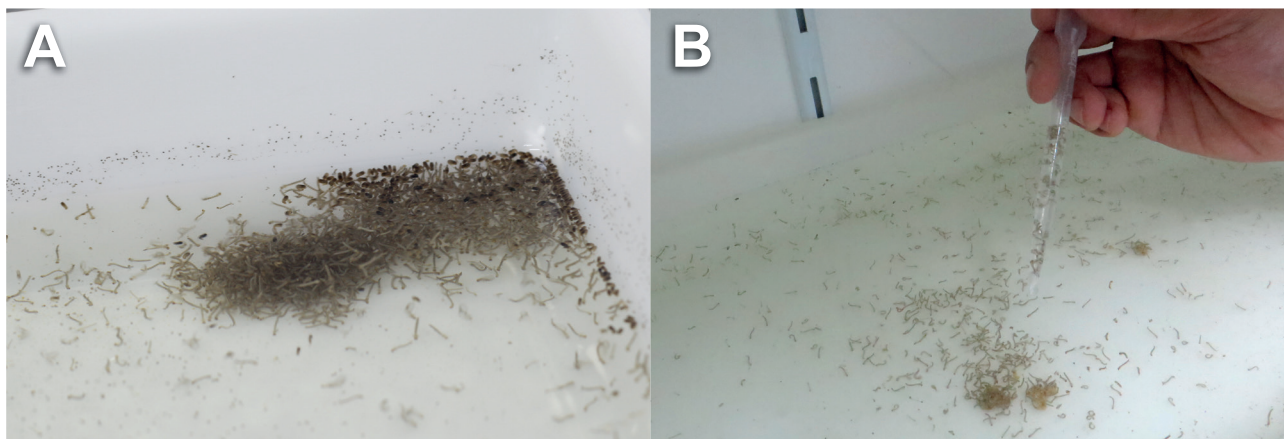
4.2.3 Manejo de pupas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

As pupas de ambas as espécies devem ser coletadas imediatamente após aparecerem nas bandejas (figura 7, A). Para isso, as bandejas devem ser inspecionadas a cada 24 horas.

A coleta é realizada manualmente com uma pipeta Pasteur de 3 mL (figura 7, B). As pupas devem ser colocadas em copos plásticos de 300 mL contendo água filtrada. Cento e cinquenta pupas podem ser colocadas em cada copo e depois distribuídas em gaiolas de adultos.

A coleta de pupas é realizada diariamente, exceto nos finais de semana. Como a pupa não se alimenta, não necessita de dieta.

Para evitar a fuga de insetos adultos durante períodos onde não possa ocorrer o monitoramento constante das pupas, aconselha-se que as larvas de quarto instar existentes nas bandejas sejam transferidas para erlenmeyers de 1000 mL e cobertas com telas para evitar que algum adulto escape. As telas dos erlenmeyers são inspecionadas e os adultos existentes podem ser liberados nas gaiolas.



Fotos: (A) Albert Oliveira e (B) Francisco Schmidt.

Figura 7. Coleta de pupas, (A) pupas nas bandejas, (B) coleta com auxílio de pipeta Pasteur de 3 mL.

4.2.4 Manejo de adultos de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*

Os adultos desses insetos são mantidos em gaiolas quadradas de 30x30x30 cm de lado, cujas laterais são cobertas por tela mosquiteira de malha 14 sombrite com 25 Mesh preto ou cinza. A parte frontal destas gaiolas possui uma “manga” de tecido, para facilitar a manipulação e limpeza, e evitar a fuga dos adultos (figura 8).



Foto: Francisco Schmidt.

Figura 8. Gaiolas de adultos de *A. aegypti*.

Os machos de mosquitos são alimentados com solução aquosa de mel a 10%, (Sasmita et al., 2019) oferecida em tira de papel de filtro autoclavado depositado em copos de 50 mL (figura 9). Esses copos devem ser trocados três vezes na semana, evitando assim, a contaminação por fungos e bactérias. Essa solução de mel pode ser armazenada em geladeira em frasco vedado, sendo possível utilizá-la por até duas semanas.



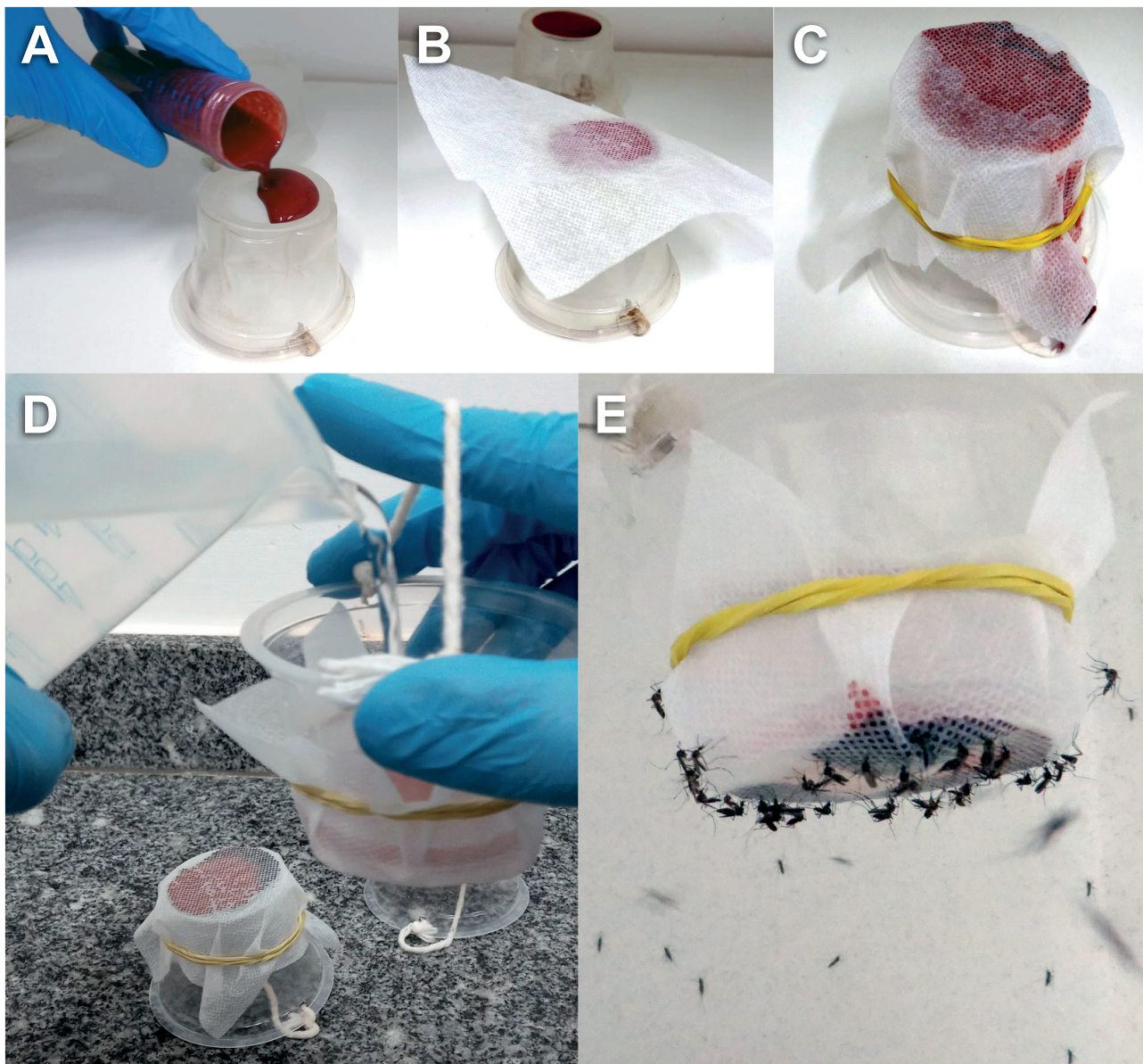
Foto: Albert Oliveira.

Figura 9. Potes de 50ml com mel 10% e tiras de papel filtro autoclavado são utilizados na alimentação dos adultos.

As fêmeas de *C. quinquefasciatus* são alimentadas com sangue de codornas criadas em biotério (Beserra et al., 2006) (vide Anexo 2 para processo de alimentação e cuidado com as aves), entretanto a plataforma de criação de insetos vem pesquisando uma forma de substituir as codornas na alimentação de *C. quinquefasciatus* em consonância com orientações do CEUA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As fêmeas adultas de *A. aegypti* recebem repasto sanguíneo, coletados em tubos vacutainer contendo anticoagulante EDTA e 6ml de sangue bovino, enriquecido com 0,375 g de Whey protein e 0,2 g de ATP/gel utilizada em equinos de alto desempenho. Variadas são as opções para a alimentação dos adultos de *A. aegypti*, a maioria baseada em sangue ou hemoderivados de vertebrados + proteína do leite + ATP + anticoagulante, escolhidos em função de finalidades específicas que terão os insetos produzidos e em função da facilidade de obtenção dos componentes utilizados (Talyuli et al., 2015; Dutra et al., 2017; Gonzales et al., 2018; Gaugler et al., 2019; Kandel et al., 2020; Mendes et al., 2018; Herculano, 2020).

Para oferecer o sangue para *A. aegypti* é necessário que o mesmo seja depositado na parte inferior de um pote de 50 mL (figura 10, A), coberto com um pedaço de tecido TNT preto (figura 10, B), fixado ao copo com elástico (figura 10, C). Em seguida esse copo é invertido e preenchido com água aquecida a 40°C (figura 10, D). O conjunto é então depositado na gaiola onde as fêmeas virão se alimentar (figura 10, E) (Anjolette; Macoris, 2016).

O repasto sanguíneo é de extrema importância, pois na sua ausência, a fêmea não faz a oviposição e tem a sua longevidade diminuída (Clements, 1963; Panizzi; Parra, 2009).



Fotos: (A) Stefany Costa, (B e C) Albert Oliveira (D e E) Francisco Schmidt.

Figura 10. Preparo do repasto sanguíneo de adultos de *A. aegypti*. (A) sangue é depositado na parte inferior de um pote de 50 mL, (B) coberto com um pedaço de tecido TNT preto, (C) fixado ao copo com elástico, (D) copo deve ser invertido e preenchido com água aquecida à 40°C, (E) o conjunto é depositado na gaiola onde as fêmeas virão de alimentar.

Na gaiola de *C. quinquefasciatus* é necessária à introdução de um copo contendo água filtrada com pedaço de ração de gato. Esse copo servirá para que as fêmeas façam oviposição em forma de “jangada” na superfície da água. Estas “jangadas” são coletadas e utilizadas imediatamente de acordo como foi descrito anteriormente.

Na gaiola de *A. aegypti* é necessária à introdução de um vasilhame de cor preta contendo tiras de papel filtro umedecidas com água para as fêmeas realizarem a oviposição. Essas tiras devem ser do mesmo tamanho do diâmetro do vasilhame. Estes copos são trocados sempre que os papéis contiverem ovos.

A limpeza das gaiolas deve ser diária, evitando assim, a proliferação de aranhas, responsáveis muitas das vezes pelo decréscimo de indivíduos adultos da gaiola. A limpeza evita, ainda, a proliferação de ácaros, responsáveis pelo surgimento de contaminações. Deve-se utilizar pano ou papel toalha umedecido com álcool 70% e passar no fundo, e nas laterais internas das gaiolas, agir delicadamente para evitar a fuga dos insetos.

5. Referências

- ANJOLETTE, A. F. F.; MACORIS, M. L. G. Técnicas para manutenção de *Aedes Aegypti* em laboratório. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 13, n. 156, p. 19-19, 2016.
- ANDERSON, T. E.; LEPPLA, N. C. (Ed.). *Advances in insect rearing for research and pest management*. Boulder, USA: Westview, 1992.
- BESERRA, E. B.; CASTRO JR, F. P. de; SANTOS, J. W. dos; SANTOS, T. da S.; FERNANDES, C. R. M. Biologia e exigências térmicas de *Aedes Aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) provenientes de quatro regiões bioclimáticas da Paraíba. **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 6, p. 853-60, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância e eliminação da filariose linfática. Brasília, DF, 2009. (Série A: Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_lariose_web.pdf. Acesso em: 1 jun. 2017.
- COETZEE, M. How important are dipteran vectors of disease in Africa? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 108, n. 4, p. 179-180, 2014. DOI: <https://doi-org.ez103.periodicos.capes.gov.br/10.1093/trstmh/tru020>
- COHEN, A. C. Ecology of insect rearing systems: a mini-review of insect rearing papers from 1906-2017. **Advances in Entomology**, v. 6, p. 86-115, 2018.
- CLEMENTS, A. N. *The physiology of mosquitoes*. [S.l.]: Elsevier, 1963. (International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Zoology, v. 17).
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1994.
- DUTRA, H. L. C.; RODRIGUES, S. L.; MANSUR, S. B.; DE OLIVEIRA, S. P.; CARAGATA, E. P.; MOREIRA, L. A. Development and physiological effects of an artificial diet for Wolbachia-infected *Aedes Aegypti*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 15687-15711, 2017.
- GAUGLER, R.; SUMAN, D. S.; CHANDEL, K.; WANG, Y. Non-membrane feeding device and diet formulation for mosquito colony production. **Patent Application Publication**. US/0246608, A1. 2019-08-15.
- GONZALES, K. K.; HANSEN, I. A.; IMMO, A. Artificial diets for mosquitoes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 13, n. 12, p. 1267, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph13121267>
- GONZALES, K. K.; RODRIGUEZ, S. D.; HAE-NA, C.; KOWALSKI, M.; VULCAN, J.; MOORE, E. L.; LI, Y.; WILLETTE, S. M.; KANDEL, Y.; VOORHIES, W. A. V.; HOLGUIN, F. O.; HANLEY, K. A.; HANSEN, I. A. The effect of skitosnak, an artificial blood meal replacement, on *Aedes Aegypti* life history traits and gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 11023, 2018.
- GRELLA, M. D. Chavetaxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto Biológico. Campinas, SP.
- GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. *The insects: an outline of entomology*. Oxford: Blackwell, 2005.
- HAMDAN, N.; KILICMAN, A. The effect of temperature on mosquito population dynamics of *Aedes Aegypti*: the primary vector of denguecete. *AIP Conference Proceedings*, v. 2266, 050002, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/5.0018084>. Acesso em: 27/10/2021.
- HERCULANO, P. H. Manutenção de *Aedes Aegypti* e *Culex Quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) em condições de laboratório: uma revisão sistemática. 2020. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, SP.
- KANDEL, Y.; MITRA, S.; JIMENEZ, X.; RODRIGUEZ, S. D.; ROMERO, A.; BLAKELY, B. N.; CHO, S. Y.; PELZMAN, C.; HANSEN, I. A.; APPERSON, C. Long-term mosquito culture with skitosnak, an artificial blood meal replacement. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 9, e0008591, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008591>. Acesso em: 15/11/2021.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Ed.). *Bioecologia e nutrição de insetos: base para o manejo integrado de pragas*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009.
- PARRA, J. R. P. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. São Paulo: USP, 1986. Apostila ESALQ/USP.
- PINA, I. G.; FONSECA, A. H. da. Comportamento de *Aedes aegypti* L., 1762 (Diptera: Culicidae) alimentados artificialmente com sangue de diferentes espécies de doadores. **Revista de Patologia Tropical**, v. 28, n. 1, p. 64-71, 1999.

- PONTES, D. de S; SOUSA, J. O. de; PEREIRA, C. C. A.; FERREIRA, V. de O. Morbimortalidade por filariose no Brasil (filariasis morbimortality in Brazil). *Temas em Saúde*, João Pessoa, v. 20, n. 4, p. 206-219, 2020.
- POSIDONIO, A. P. V.; OLIVEIRA, L. H. G.; RIQUE, H. L.; NUNES, F. C. The longevity of *Aedes Aegypti* mosquitoes is determined by carbohydrate intake. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 1, p. 162-168, 2021.
- RIBEIRO NETO, J. A.; ALVES, S. N. Aspectos éticos na utilização de codornas (*Coturnix Coturnix Japonica*) nas pesquisas entomológicas. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 250-254, 2013.
- SASMITA, H. I.; TU, W. C.; BONG, L. J.; KOK-BOON, H. Effects of larval diets and temperature regimes on life history traits, energy reserves and temperature tolerance of male *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae): optimizing rearing techniques for the sterile insect programmes. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 578-578, 2019.
- SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da S. Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).
- SILVA, H. H. G. da; SILVA, I. G. da; LIRA, K. da S. Metodologia de criação, manutenção de adultos e estocagem de ovos de *Aedes Aegypti* (Linnaeus, 1762) em laboratório. **Revista de Patologia Tropical**, v. 27, n. 1, p. 53-63, 1998.
- SINGH, P. Artificial diets for insects, mites, and spiders. New York: IFI/Plenum, 1977.
- SINGH, P.; MOORE, R. F. (Ed.). Handbook of insect rearing. Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 2.
- SPEIGHT, M. R.; HUNTER, M. D.; WATT, A. D. Ecology of insects: concepts and applications. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.
- TALYULI, O. A. C.; BOTTINO-ROJAS, V.; TARACENA, M. L.; SOARES, A. L. M.; OLIVEIRA, J. H. M.; OLIVEIRA, P. L. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study *Aedes Aegypti* physiology. **Journal of Insect Physiology**, v. 83, p. 1-7, 2015.
- TISSOT, A. C.; SILVA, M. A. N. da. Lista das espécies de Culicidae (Diptera) depositadas na Coleção de Entomologia Pe. J. S. Moure. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 2, p. 263-268, 2008.
- WHO. Global Programme to Eliminate Lymphatic Filariasis: progress report, 2014. **Weekly Epidemiological Record**, v. 90, n. 38, p. 489-504, 2015.

Anexo I

Criação de codornas em biotério

As codornas são criadas em gaiolas do tipo aramadas com dimensão de 50 cm por 70 cm por 30 cm que permitem que as aves sejam mantidas levando em consideração o bem-estar delas, seguindo a orientação da Associação Veterinária Mundial (WVA) que visam o bem-estar dos animais utilizados em pesquisa (Ribeiro Neto; Alves, 2013). As gaiolas são mantidas dentro biotério à 26 ± 2 °C fornecida por condicionadores de ar. As aves são alimentadas diariamente com 25 g de ração de codornas por indivíduo. A vasilha com 450 ml de água é reabastecida e limpa, diariamente. As aves tomam banho de sol diariamente por 30 minutos no período da manhã 8:00 e 10:00 horas) retirando, para esse fim, as gaiolas com as codornas para o lado de fora do biotério.

Nas sextas-feiras, no final do dia, é colocada uma quantidade de ração e água suficientes para alimentação das codornas no final de semana.

Limpeza das gaiolas

As gaiolas são limpas três vezes por semana, segundas, quartas e sextas feiras, da seguinte forma:

- a) Transferir as codornas para uma outra gaiola;
- b) Retirar o bebedouro e lavar com água e sabão com auxílio de esponja. Enxaguar bem o bebedouro para evitar intoxicação dos animais;
- c) Retirar o comedouro para limpeza do mesmo e colocar em seguida nova ração.
- d) Retirar os papelões ou jornais usados para forrar o fundo das gaiolas, enrolar e descartar em lixo comum. Pode ser utilizado maravalhas no lugar de folhas de jornal caso haja facilidade de conseguir este material (Ribeiro Neto; Alves, 2013);
- e) Limpar as gaiolas, suas laterais e as bandejas com uma esponja molhada e detergente ou sabão para retirada das fezes.
- f) Enxaguar todas as partes ensaboadas das gaiolas;
- g) Forrar o fundo das gaiolas com papelões ou jornais limpos;
- h) Voltar as codornas para as gaiolas;
- i) 2- Limpeza do biotério é feita diariamente obedecendo os seguintes critérios:
- j) Retirar todas as gaiolas e todos os materiais para fora do biotério para facilitar a limpeza e organização;
- k) Recolher os papéis que ficam abaixo das gaiolas (este papel é trocado uma vez por semana, as sextas-feiras);
- l) Varrer o biotério todos os dias;
- m) Lavar o chão com água e sabão do tipo detergente neutro a cada 15 dias;
- n) Forrar o chão com papelão;
- o) Voltar as gaiolas para dentro do biotério.

Retirada das codornas para o repasto sanguíneo

- a) As codornas são usadas para repasto sanguíneo de acordo com a demanda da Plataforma de criação de insetos, normalmente às segundas, quartas e sextas-feiras, mantendo um intervalo mínimo de 48 horas entre um repasto sanguíneo e outro (Ribeiro Neto; Alves, 2013; Beserra et al., 2006);
- b) Selecionar as codornas para o repasto sanguíneo dos mosquitos de acordo com as características abaixo:
 - Indivíduos ativos;
 - Ausência de secreções nasal e ocular;
 - Sem sinais de diarreia.
- c) Quando do repasto sanguíneo, antes de levar as codornas para a Plataforma de criação de insetos, aplicar intramuscular, no peito ou na coxa, 0,1 ml de anestésico (cloridrato de xilazina 2%) por codorna;
 - Aguardar fazer efeito, ou seja, aguardar que as codornas estejam sedadas, retirar as penas da região dorsal (costas) das codornas para facilitar o repasto sanguíneo;
- d) Colocar as codornas em uma gaiola pequena;
- e) Levar as codornas para a Plataforma, na quantidade de uma codorna por gaiola de mosquitos adultos;
- f) Colocar as pequenas gaiolas com as codornas dentro das gaiolas dos mosquitos durante toda à noite;
- g) É importante observar que as codornas utilizadas para o repasto na segunda-feira, não são as mesmas utilizadas no outro dia. É realizado um rodízio para que as codornas passem por um período de descanso de 48 horas;
- h) No dia seguinte, pela manhã, retirar as codornas das gaiolas dos mosquitos;
- i) Retornar as codornas para o biotério.

Anexo II

Protocolo de sangue bovino para criação de *Aedes aegypti* (PCPI)

O sangue bovino, é coletado em tubos de coleta contendo anticoagulante EDTA e armazenado à temperatura de -20°C até sua utilização.

Preparo do Sangue

- a) Aguardar o sangue descongelar e alcançar a temperatura ambiente;
- b) Para cada tubo de 3 ml de sangue bovino é adicionado 0.375g de Whey protein e 0.2g de ATP;
- c) Misturar todos os componentes com o sangue em um tubo Falcon, agitar manualmente por 1 minuto ou até a sua homogeneização;

- d) Colocar o sangue no fundo dos potinhos de 100ml e cobrir um pequeno pedaço de tecido TNT e prender com elástico;
- e) Dentro do potinho colocar água aquecida a aproximadamente 40°C e fechar com a tampa;
- f) Pendurar no teto de cada gaiola de Aedes um potinho com sangue aquecido;
- g) No dia seguinte, descartar os tecidos de TNT no lixo branco e esterilizar os potinhos com água sanitária.



*Recursos Genéticos e
Biotecnologia*



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

