

Revista de Saúde Pública

Journal of Public Health

Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* l.s. em área de agroecossistema irrigado

Parity and ovarian development of *Anopheles albitarsis* l.s. in irrigated agroecosystem field

Iná Kakitani e Oswaldo Paulo Forattini

Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). São Paulo, SP, Brasil

Paridade e desenvolvimento ovariano de *Anopheles albitarsis* I.s. em área de agroecossistema irrigado*

Parity and ovarian development of *Anopheles albitarsis* I.s. in irrigated agroecosystem field

Iná Kakitani e Oswaldo Paulo Forattini

Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP). São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Anopheles, fisiologia. Paridade, fisiologia. Paridade, fisiologia. Análise de sobrevivência.

Keywords

Anopheles, physiology. Parity, physiology. Survival analysis.

Resumo

Objetivo

Conhecer a paridade, o desenvolvimento ovariano e a razão de sobrevivência da espécie *Anopheles albitarsis*, visando a estimar o potencial de transmissão malárica.

Métodos

Dois populações de *Anopheles albitarsis*, denominadas A e B, foram capturadas na Fazenda Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas, situada no Município de Pariqueira-Açu, Estado de São Paulo. As capturas foram feitas no período crepuscular vespertino das 17h às 20h, utilizando-se armadilha tipo Shannon. As disseções foram feitas utilizando-se a técnica de Polovodova, e a avaliação do desenvolvimento folicular segundo o critério de Christophers e Mer. Adotou-se o método de Vercurse para se estimar a sobrevivência diária e o método de Davidson para se determinar a duração do ciclo gonotrófico.

Resultados

Foram dissecados 2.612 exemplares, sendo 237 da população A e 2.375 da B. As sobrevivências diárias para as populações A e B foram de $0,5339 \pm 0,047$ e $0,5566 \pm 0,015$, respectivamente, e a duração do ciclo gonotrófico para a população A foi de 1.990 dias e para a B de 2.046 dias.

Conclusões

Os resultados contribuem para a avaliação do potencial de transmissão malárica na região.

Abstract

Introduction

To determine the parity, ovarian development and survival rates of *Anopheles albitarsis* species, in order to estimate the potential of malaria transmission.

Methods

Two populations of *Anopheles albitarsis* A and B in an Experimental Farm of S. Paulo State, Brazil were captured during the crepuscular sunset, between 5PM and 8PM, using Shannon traps. Dissections were performed using Polovodova's technique, and the evaluation of follicular development was according to Christophers and Mer's criterion. The Vercurse method was used to estimate daily survival and we applied Davidson method to determine the duration of the gonotrophic cycle.

Correspondência para/Correspondence to:

Iná Kakitani
Av. Dr. Arnaldo, 715
01246-904 São Paulo, SP – Brasil
E-mail: tani@usp.br

*Trabalho realizado no Núcleo de Pesquisa Taxonômica e Sistemática em Entomologia Médica (NUPTM/FSP/USP). Pesquisa financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (Processo nº 95/0381-4), como parte do projeto temático. Edição subvencionada pela Fapesp (Processo nº 100/01601-8). Recebido em 18/1/1999. Reapresentado em 10/8/1999. Aprovado em 10/9/1999.

Results

A total of 2,612 specimens was dissected, of these, 237 of population A and 2,375 of population B. The daily survival rates were 0.5339 ± 0.047 and 0.5566 ± 0.015 , respectively, for the populations A and B. The duration of the gonotrophic cycle for population A was 1,990 days and for population B 2,046 days.

Conclusions

The results help to estimate the malaria transmission potential in the region.

INTRODUÇÃO

São essenciais os estudos sobre a dinâmica populacional dos principais vetores da malária. Nesse sentido, tornam-se particularmente importantes as observações que levam à análise de alguns parâmetros entomológicos, tais como a composição etária, a longevidade e a razão de sobrevivência da população potencialmente vetora. Essa determina o tamanho da população com capacidade de transmitir a infecção e também prevê a duração média da vida infectiva do transmissor (Milby e Reisen,¹⁰ 1989). Ao mesmo tempo, pode auxiliar na avaliação do impacto das medidas de controle dos vetores. A quantificação da intensidade de transmissão da malária está basicamente fundamentada na reprodutividade basal (R_0) de MacDonald⁹ (1957), cuja estimativa depende de variáveis de natureza parasitológica e entomológica. Já o conceito de capacidade vetorial (C.) de Garrett-Jones⁶ (1964) utiliza somente parâmetros entomológicos como a densidade, proporção de picadas em humanos, antropofilia e sobrevivência.

Estimar a sobrevivência do vetor, ou a probabilidade do mesmo sobreviver por um dia, implica o conhecimento prévio da paridade e da duração do ciclo gonotrófico (g) do mosquito, que é o intervalo entre oviposições, ou seja, o espaço de tempo decorrido entre a procura e o encontro do hospedeiro para sugar e a realização de novo repasto sanguíneo, implicando a digestão do sangue ingerido e a postura dos ovos.

A duração do ciclo gonotrófico é de fundamental importância porque revela a frequência de contato do vetor com o hospedeiro e, assim, fornece estimativa da oportunidade para aquisição e transmissão do parasita (Klowden e Briegel,⁸ 1994).

A estimativa da duração média do ciclo gonotrófico na população de mosquitos pode ser feita pela observação direta ou indireta, com fêmeas de laboratório ou de campo. A técnica de marcação e recaptura é bastante utilizada com essa finalidade e consiste em soltar fêmeas marcadas, coletá-las e examiná-las para verificação do desenvolvimento ovariano.

A determinação da idade do mosquito pode ser feita pela observação de pequenas dilatações alveolares

deixadas no tubo folicular como consequência do desenvolvimento do óvulo. Assim sendo, pode-se considerar a ocorrência de um ciclo ovariano a cada dilatação encontrada e, conseqüentemente, o número de dilatações será igual ao seu grau de paridade.

Com os critérios preconizados por Polovodova e Detinova, foram realizados vários estudos para se estimar o estado de paridade associado à sobrevivência, tanto em condições naturais como laboratoriais, focalizando-se principalmente populações de importância vetorial.

Entretanto, motivados pelo baixo grau de paridade e por certas aberrações encontradas em algumas espécies de mosquito, foram desenvolvidos novos estudos no decênio de 80, modificando-se a interpretação e a conceituação anteriores. Tais modificações levaram a novos conceitos, iniciados por Lange e Hoc (1981) apud Hoc e Charlwood⁷ (1990), e denominados, segundo Fox e Brust⁵ (1994), de "Escola Nova".

Para a Escola Nova, as dilatações encontradas são de natureza abortiva, isto é, resultantes de oogênese anormal, e somente a presença de saco folicular indicará a ocorrência de oogênese normal. Todavia, dada a pouca praticidade do método, aliada à atual falta de consenso interpretativo, deixou-se de seguir essa orientação no presente trabalho.

A determinação do estado de paridade em mosquitos requer estudos mais detalhados, principalmente em populações epidemiologicamente importantes. Dentre elas, pode-se considerar a que passou a participar da comunidade antrópica graças às transformações ambientais motivadas pela implementação da irrigação artificial. Trata-se de *Anopheles albitarsis*, atualmente considerado como um complexo de espécies.

Posto isto, o objetivo da presente pesquisa é contribuir para estimar o potencial de transmissão malárica que as populações de *An. albitarsis* oferecem à comunidade, investigando alguns parâmetros essenciais na determinação da capacidade vetora dessas populações como: a idade fisiológica através da paridade; a sobrevivência diária dos mosquitos capturados no campo; a duração do ciclo gonotrófico; e frequência das populações focalizadas no ambiente estudado, modificado pelo homem.

MÉTODOS

As observações foram realizadas na região do Vale do Ribeira, na Fazenda Experimental do Instituto Agronômico de Campinas, situada no Município de Pariqueira-Açu, Estado de São Paulo. A localização geográfica do ponto em estudo corresponde a 24°30' de latitude Sul e 47°50' de longitude Oeste. Nessa localidade, a precipitação pluviométrica anual é de 2.250 mm, com temperatura média oscilando de 18°C a 25°C e a umidade relativa do ar ao redor de 80%. A descrição pormenorizada das características geográficas e biológicas foram feitas por Forattini et al² (1993). O local escolhido para as observações mostra considerável modificação ambiental, com a existência de sistema artificial de irrigação para o cultivo de arroz, condição propícia à proliferação de várias espécies de mosquitos, especialmente dos gêneros *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Mansonia* e *Coquillettidia*. No que concerne ao primeiro, o complexo *Anopheles albitarsis* l.s. contribuiu com 26,2% dos mosquitos capturados nessa área (Forattini et al,³ 1993). Apesar da ação humana ser marcante na área, ainda pode-se observar manchas de matas residuais que conservam as características de mata primária, ainda que em grau variável.

Procedimento em campo

Procedeu-se à coleta de formas adultas mediante o emprego da técnica baseada na utilização da armadilha tipo Shannon, com uma fonte luminosa e dois capturadores. A armadilha foi instalada na margem da quadra de arroz. As coletas foram regulares durante o período de março de 1992 a dezembro de 1993, obedecendo um ritmo bimensal no horário das 17h às 20h.

Procedimento em laboratório

Os mosquitos capturados na armadilha de Shannon eram transportados vivos em gaiolas até o laboratório. Em seguida, a amostra da espécie em estudo era separada aleatoriamente de forma não-probabilística, obedecendo-se às variações da densidade populacional no decorrer do ano. Assim, para as capturas com número elevado de mosquitos da espécie em estudo, padronizou-se retirar até 200 exemplares vivos para as dissecações. Se esse número era inferior a 200, todos os exemplares vivos foram dissecados para se verificar a condição de paridade através da técnica de Polovodova. Examinando-se de 15 a 20 ovariolos por fêmea e o desenvolvimento folicular, segundo os critérios de Christophers e de Mer, classificando-os em fases de I a V. Optou-se pelo conceito da Escola Clássica, por essa apresentar vantagens sobre o conceito da Escola Nova, como a praticidade e a conceituação teórica mais consolidada. Dessa maneira, de acordo com a Escola Clássica, o que foi designado como P (oníparas) foram as dilatações e o saco ovarioilar, indistintamente. Até o momento da dissecação, todo ma-

terial foi conservado em tubo de Borrel, previamente preparado com chumaco de algodão sob uma rodela de papel de filtro, ambos umedecidos no fundo do tubo. A extremidade aberta foi fechada com um pedaço de gaze.

A identificação do material foi feita utilizando-se de característica morfológica para separar as espécies do complexo *An. albitarsis*. Segundo Wilkerson et al¹³ (1995), pelos estudos feitos com a utilização de técnicas de "Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)", verificou-se a existência de 4 espécies crípticas nesse complexo. Dessas, duas podem ser diferenciadas pela proporção de negro basal no segundo tarsômero posterior, como segue (Forattini et al,⁴ 1995):

Espécie A – O segundo tarsômero posterior com 50% ou menos de negro basal;

Espécie B – O segundo tarsômero posterior com mais de 50% de negro basal.

O método escolhido para se estimar a sobrevivência diária (p) foi o de Vercrusse¹² (1985), que separa as fêmeas em três grupos distintos, de acordo com a paridade e o estágio do desenvolvimento folicular (segundo Christophers e Mer), assim designados:

NP₁ – Pré-grávidas: fêmeas nulíparas com os folículos nos estágios I e II de Christophers e Mer;

NP₂ – Nulíparas: fêmeas nulíparas com os folículos além do estágio II de Christophers e Mer;

P – Fêmeas oníparas.

Em seguida calculou-se as proporções de cada grupo na população examinada.

$$n_1 = \frac{NP_1}{NP_1 + NP_2 + P}$$

$$n_2 = \frac{NP_2}{NP_1 + NP_2 + P}$$

$$n_3 = \frac{P}{NP_1 + NP_2 + P}$$

Sendo:

n₁ = proporção das fêmeas nulíparas com os folículos nos estágios I e II de Christophers e Mer;

n₂ = proporção das fêmeas nulíparas com os folículos além do estágio II de Christophers e Mer e

n₃ = proporção das fêmeas oníparas.

Logo: n₁ + n₂ + n₃ = 1

Se a população estudada for dividida em três grupos distintos, têm-se três estimativas da razão de sobrevivência.

Onde:

$$E_{(n_1)} = \frac{1-p^2}{1-p^2+p} \Rightarrow (1-n_1)p^2 + n_1p - (1-n_1) = 0$$

$$E_{(n_2)} = \frac{p(1-p^2)}{1-p^2+p} \Rightarrow p^3 - n_2p^2 + p(n_2-1) + n_2 = 0$$

$$E_{(n_3)} = \frac{p^3}{1-p^2+p} \Rightarrow p^3 + n_3p^2 - n_3p - n_3 = 0$$

A melhor estimativa de p foi obtida através da determinação de mínimo da função:

$$\sum_{i=1}^3 [n_i - E(n_i)]^2$$

$$f(p) = \left[n_1 - \frac{(1-p^2)}{1-p^2+p} \right]^2 + \left[n_2 - \frac{p(1-p^2)}{1-p^2+p} \right]^2 + \left[n_3 - \frac{p^3}{1-p^2+p} \right]^2$$

Para o cálculo do erro padrão, utilizou-se a equação:

$$S.E.p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 [n_i - E(n_i)]^2}{\text{total de mosquitos capturados}}}$$

A duração do ciclo gonotrófico foi estimada pelo método vertical, baseada na proporção de fêmeas oníparas na população, fêmeas que ultrapassaram uma fase crítica de sua vida, a oviposição.

Para tanto, utilizou-se a equação proposta por Davidson¹ (1954). Assim:

$$s = \sqrt[3]{\frac{\text{fêmeas oníparas}}{\text{total}}}$$

Sendo: s = sobrevivência diária e g = duração do ciclo gonotrófico.

Essa equação, na forma logarítmica, será:

$$\ln s = \frac{1}{g} \ln \frac{\text{fêmeas oníparas}}{\text{total}}$$

RESULTADOS

Do material coletado, foram dissecados 2.612 exemplares, sendo 2.375 (90,9%) da população B e 237 (9,1%) da A (Tabelas 1 e 2).

Em relação ao desenvolvimento folicular, pôde-se observar que a proporção de fêmeas com os folículos desenvolvidos, além da fase II de Christophers e Mer, foi pequena: de 1,8% a 2,5% para as populações B e A, respectivamente (Tabelas 3 e 4). As proporções do grau de paridade para as duas populações de *Anopheles*

Tabela 1 - Paridade das fêmeas de *An. albicansis* A capturadas com armadilha de Shannon na Fazenda Experimental, Município de Pariqueira-Açu, no período de março de 1992 a dezembro de 1993.

Meses	N de Dissecções	NP		1P		2P		Não determinado	
		N	%	N	%	N	%	N	%
1992									
Março	9	5	55,5	4	44,4	-	-	-	-
Abril	22	14	63,6	5	22,7	2	9,1	1	4,5
Maio	9	7	77,7	2	22,2	-	-	-	-
Junho	13	10	76,9	3	23,1	-	-	-	-
Julho	8	2	25,0	5	62,5	-	-	1	12,5
Agosto	3	1	33,3	2	66,6	-	-	-	-
Setembro	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Outubro	1	1	100,0	-	-	-	-	-	-
Novembro	3	3	100,0	-	-	-	-	-	-
Dezembro	11	8	72,7	2	18,2	1	9,1	-	-
1993									
Janeiro	58	51	87,9	6	10,3	1	1,7	-	-
Fevereiro	25	12	48,0	13	52,0	-	-	-	-
Março	28	24	85,7	4	14,3	-	-	-	-
Abril	19	12	63,1	7	36,8	-	-	-	-
Maio	4	2	50,0	1	25,0	1	25,0	-	-
Junho	7	3	42,8	2	28,6	2	28,6	-	-
Julho	4	2	50,0	-	-	-	-	2	50,0
Agosto	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Setembro	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Outubro	7	5	71,4	2	28,6	-	-	-	-
Novembro	2	1	50,0	1	50,0	-	-	-	-
Dezembro	4	3	75,0	1	25,0	-	-	-	-
Total	237	166	70,0	60	25,3	7	2,9	4	1,7

NP - Nulíparas
1P - Uníparas
2P - Biparas

Tabela 2 - Paridade das fêmeas de *An. albitarsis* B, capturadas com armadilha de Shannon na Fazenda Experimental, Município de Pariquera-Açu, no período de março de 1992 a dezembro de 1993.

Meses	N de Dissecções	NP		1P		2P		3P		Não determinado	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1992											
Março	52	41	78,8	9	17,3	-	-	-	-	2	3,8
Abril	79	50	63,3	28	35,4	1	1,3	-	-	-	-
Mai	96	66	68,7	26	27,1	2	2,1	-	-	2	2,1
Junho	82	33	40,2	47	57,3	2	2,4	-	-	-	-
Julho	46	32	69,6	11	23,9	2	4,3	-	-	1	2,2
Agosto	15	6	40,0	8	53,3	1	6,7	-	-	-	-
Setembro	73	37	50,7	34	46,6	2	2,7	-	-	-	-
Outubro	54	37	68,5	9	16,7	6	11,1	1	1,8	1	1,8
Novembro	89	69	77,5	15	16,8	3	3,4	1	1,1	1	1,1
Dezembro	65	52	80,0	12	18,5	1	1,5	-	-	-	-
1993											
Janeiro	152	134	88,1	18	11,8	-	-	-	-	-	-
Fevereiro	111	92	82,9	19	17,1	-	-	-	-	-	-
Março	346	278	80,3	65	18,8	3	0,9	-	-	-	-
Abril	173	119	68,8	50	28,9	2	1,1	-	-	2	1,1
Mai	95	71	74,7	21	22,1	3	3,1	-	-	-	-
Junho	95	55	57,9	31	32,6	6	6,3	2	2,1	1	1,0
Julho	66	28	42,4	30	45,4	6	9,1	2	3,0	-	-
Agosto	77	37	48,0	34	44,1	4	5,2	1	1,3	-	-
Setembro	85	46	54,1	30	35,3	2	2,3	2	3,5	4	4,7
Outubro	191	101	52,9	78	40,8	10	5,2	1	0,5	1	0,5
Novembro	225	173	76,9	47	20,9	4	1,8	-	-	1	0,4
Dezembro	108	89	82,4	18	16,7	1	0,9	-	-	-	-
Total	2.375	1.646	69,3	640	26,9	61	2,6	11	0,5	16	0,7

3P - Tripara

albitarsis l.s. podem ser observadas nas Tabelas 1 e 2. Considerou-se o grupo das nulíparas como sendo NP₁ + NP₂, uma vez que o valor de NP₂ foi muito pequeno. Assim sendo, para as populações A e B, foram obtidos:

População A: p₁ = 0,3551

p₃ = 0,7026

População B: p₁ = 0,3712

p₃ = 0,7123

Pela determinação do mínimo da soma dos quadrados, foi obtida a melhor estimativa de p para as duas populações. Para a população A, foi de 0,5339 ± 0,047 e, para a B, 0,5566 ± 0,015.

Com esses valores da sobrevivência, estimou-se a duração do ciclo gonotrófico através da equação de Davidson.¹ A duração foi de 1.990 dias para a população A e de 2.046 dias para a B.

DISCUSSÃO

A população de *An. albitarsis* B foi claramente predominante em todas as capturas, o que já havia sido relatado por Forattini et al⁴ (1995). Aspecto importante foi a elevada percentagem de fêmeas da população A (97,5%) e da população B (98,2%) que apresentaram os seus folículos nos estágios I e II de Christophers e Mer, indicando ser essa a primeira tentativa hematófaga para dar início a um ciclo gonotrófico. Esse fato permite levantar a hipótese da provável existência de concordância

gonotrófica. Isso permitiu considerar o grupo das nulíparas como sendo NP₁ + NP₂, uma vez que o valor de NP₂ foi muito pequeno. Provavelmente, um único repasto sanguíneo foi suficiente para completar o primeiro ciclo gonotrófico.

Tabela 3 - Estágio do desenvolvimento folicular segundo Christophers e Mer das fêmeas de *An. albitarsis* A capturadas com armadilha de Shannon na Fazenda Experimental, Município de Pariquera-Açu, no período de março de 1992 a dezembro de 1993.

Paridade	Fase I e II		Fase III a V		Total
	N	%	N	%	
NP	164	98,8	2	1,2	166
1P	60	100,0	0	-	60
2P	7	100,0	0	-	7
Não determinado	-	-	4	100,0	4
	231	97,5	6	2,5	237

Tabela 4 - Estágio do desenvolvimento folicular segundo Christophers e Mer das fêmeas de *An. albitarsis* B capturadas com armadilha de Shannon na Fazenda Experimental, Município de Pariquera-Açu, no período de março de 1992 a dezembro de 1993.

Paridade	Fase I e II		Fase III a V		Total
	N	%	N	%	
NP	1.627	98,8	19	1,1	1.646
1P	633	98,9	7	1,1	640
2P	61	100,0	0	-	61
3P	11	100,0	0	-	11
4P	1	100,0	0	-	1
Não determinado	-	-	16	100,0	16
Total	2.333	98,2	42	1,8	2.375

A sobrevivência diária (p) obtida por meio dos espécimes capturados no campo foi relativamente baixa, tanto para a população A como para a B, ao redor de 50%, provavelmente devido à alta percentagem de fêmeas nulíparas na população.

Segundo Russel¹¹ (1987), se a sobrevivência diária é de 50%, então menos de 1% das fêmeas sobrevivem o tempo necessário para que o *Plasmodium vivax* complete o período de incubação extrínseco no mosquito. Já para o *P. falciparum*, no qual esse período é maior, a taxa de sobrevivência diária deverá ser de 0,65 para que o mesmo percentual de fêmeas se torne infectivo na população. Embora o fator longevidade seja fundamental na determinação da capacidade vetorial, não se deve analisá-lo isoladamente e sim em conjunção com a densidade e a antropofilia.

A alta percentagem de fêmeas nulíparas na população, como mostram as Tabelas 1 e 2, indica não somente a

produção em escala contínua de mosquitos, mas também alta mortalidade dos emergentes (Vercrusse,¹² 1985). Outra interpretação poderia ser a de captura feita em local próximo a um criadouro, embora nesse caso devesse haver um número expressivo de indivíduos masculinos.

Diante de tais resultados, observou-se que:

– Há provável concordância gonotrófica, pelo menos de acordo com os resultados obtidos e as populações locais. Isso indica a possibilidade de veiculação malárica, cuja medição poderá incluir esses dados.

– Tudo indica que a alteração do ambiente na região provocada pelo homem facilitará o desenvolvimento de populações potencialmente vetorais, como é o caso de *An. albitarsis* l.s. Dessa forma, com o passar do tempo e se não houver previsões adequadas, é de se supor que a malária poderá ser reintroduzida na área.

– A se comprovar a hipótese supra, essa endemia terá aspectos epidemiológicos diferentes daqueles que, classicamente, eram-lhe antes atribuídos.

REFERÊNCIAS

- Davidson G. Estimation of the survival-rate of anopheline mosquitoes in nature. *Nature* 1954;174:792-3.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 2 - Immature stages survey at the rice irrigation system in the Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 1993;27:227-36.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 3 - Survey of adult stages at the rice irrigation system and the emergence of *Anopheles albitarsis* in South-Eastern, Brazil. *Rev Saúde Pública* 1993;27:313-25.
- Forattini OP, Kakitani I, Massad E, Marucci D. Studies on mosquitoes (Diptera: Culicidae) and anthropic environment. 7 - Behaviour of adults *Nyssorhynchus anophelines* with special reference to *Anopheles albitarsis* s.l. in South-Eastern, Brazil. *Rev Saúde Pública* 1995;29:20-6.
- Fox AS, Brust RA. How do dilatations form in mosquito ovarioles? *Parasitol Today* 1994;10:19-23.
- Garrett-Jones C. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. *Bull World Health Organ* 1964;30:241-61.
- Hoc TQ, Charlwood JD. Age determination de *Aedes cantans* using the ovarian oil injection technique. *Med Vet Entomol* 1990;4:227-33.
- Klowden MJ, Briegel H. Mosquito gonotrophic cycle and multiple feeding potential: Contrasts between *Anopheles* and *Aedes* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 1994;31:618-22.
- MacDonald G. *The epidemiology and control of malaria*. London: Oxford University Press; 1957.
- Milby MM, Reisen WK. Estimation of vectorial capacity: vector survivorship. *Bull Soc Vector Ecol* 1989;14:47-54.
- Russel RC. Seasonal abundance, longevity and population age composition of potencial malaria vectors in Northern and Southern Australia. *Aust J Zool* 1987;35:289-306.
- Vercrusse, J. Estimation of the survival rate of *Anopheles arabiensis* in an urban area (Pikine - Senegal). *J Anim Ecol* 1985;54:343-50.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Klein TA, Gaffigan TV, Bergo E, Consolim J. Diagnosis by random amplified polymorphic dna polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J Med Entomol* 1995;32:697-704.