

Vigilância automatizada e remota de mosquitos na Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE): implementação de armadilhas com um novo sistema de sensores óticos para a classificação automática de mosquitos

Automated and remote surveillance of mosquitoes in the National Vector Surveillance Network (REVIVE) in Portugal: implementation of traps with a new optical sensor system for automatic classification of mosquitoes

Hugo Costa Osório¹, Manuel Silva¹, João Encarnação², Líbia Zé-Zé¹, Fátima Amaro¹, Maria João Alves¹

hugo.osorio@insa.min-saude.pt

(1) Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas. Departamento de Doenças Infeciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) IRIDEON S.L., Barcelona, Espanha

Resumo

No âmbito da Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), é realizada a vigilância entomológica em mosquitos desde 2008 em Portugal. O projeto REVIVE é uma componente dos programas de vigilância epidemiológica indispensável à avaliação do risco de transmissão de agentes patogénicos transmitidos por vetores e é fundamental para a implementação de uma estratégia integrada de controlo de vetores e prevenção de doenças. As atividades previstas nos programas de vigilância entomológica e doenças associadas exigem elevados custos com recursos humanos especializados e com a logística que é investida nas inspeções periódicas das armadilhas de insetos. É essencial o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para a monitorização de vetores. O projeto VECTRACK propõe o desenvolvimento de um método inovador na vigilância de mosquitos vetores de agentes de doença que vai possibilitar a identificação da espécie, sexo, idade e potencial de infeção das populações de mosquitos, mas de forma automatizada e remota. Neste artigo apresentamos os principais protocolos usados no projeto VECTRACK para a configuração de um sensor acoplado a uma armadilha que proceda à identificação automatizada de mosquitos através de *machine learning*.

Abstract

Within the scope of the Vector Surveillance Network (REVIVE), entomological surveillance of mosquitoes has been carried out since 2008 in Portugal. REVIVE project is an essential component of epidemiological surveillance programs to assess the risk of transmission of vector-borne pathogens and is essential for the implementation of an integrated strategy for vector control and disease prevention. The activities foreseen in the entomological surveillance programs and associated diseases demand high costs with specialized human resources and with the logistics that are invested in the periodic inspections of insect traps. The development of sustainable strategies for vector monitoring is essential. The VECTRACK project proposes the development of an innovative method in the surveillance of mosquito vectors of disease agents that will make it possible to identify the species, sex, age and infection potential of mosquito populations, but in an automated and remote way. In this manuscript, we present the main protocols used in the VECTRACK project for the configuration of a sensor coupled to a trap that performs the automated identification of mosquitoes through *machine learning*.

Introdução

Os programas tradicionais de vigilância de mosquitos, nos quais a Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE) se insere envolvem várias atividades que têm como principais objetivos 1) a identificação das espécies presentes, 2) a monitorização da composição e abundância das populações, 3) a deteção de espécies invasoras/exóticas, 4) a pesquisa de agentes transmitidos e 5) a avaliação de medidas de intervenção que contribuam para uma estratégia integrada de controlo de mosquitos vetores. De um modo geral, a vigilância entomológica dirigida aos mosquitos vetores baseia-se em armadilhas coletoras que são inspecionadas regularmente e analisadas no laboratório (1).

As principais limitações deste sistema de vigilância tradicional são 1) o custo e o tempo relativo aos recursos humanos, técnicos operacionais que são responsáveis pelas inspeções das armadilhas instaladas no exterior e envio das amostras para o laboratório para identificação e análise, e 2) o atraso criado entre o momento em que a armadilha é colocada e inspecionada. Esta discrepância pode ser crucial e levar a que a análise da dinâmica das populações de mosquitos no campo não seja precisa e produzida em tempo útil para uma intervenção eficaz ou para uma interpretação correta e atempada da epidemiologia de um agente, no caso de surto epidémico.

O projeto VECTRACK (*Earth observation service for preventive control of insect disease vectors* – Sistema de observação terrestre para a monitorização e controlo de mosquitos vetores de doença), integrado no programa de



apoio à inovação do Conselho Europeu de Inovação e no programa Horizonte 2020, propõe o desenvolvimento de um método inovador na vigilância de mosquitos vetores de agentes de doença que vai possibilitar a identificação da espécie, sexo, idade e potencial de infeção das populações de mosquitos, de uma forma completamente automatizada e remota. Este sistema, associado a um serviço sentinela por satélite, propõe-se a obter mapas de distribuição geográfica e temporal em tempo-real para vigilância dos mosquitos vetores e avaliação de risco das doenças associadas. Este projeto, ainda em curso (2019-2023), conta com a participação de quatro entidades de três países europeus: Bélgica, Espanha e Portugal, este último representado pelo Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

As “armadilhas inteligentes” e sistemas de monitorização remota produzem dados totalmente interoperáveis e, portanto, disponíveis para a execução automática de modelos de previsão, para a realização de avaliações de risco, a emissão de alertas e a realização de análises históricas de áreas infestadas. Deste modo, podem ser estabelecidos programas de vigilância automática com precisão e agilidade, superando o problema dos custos de mão de obra relacionados com as inspeções manuais. Além desta vantagem, as espécies de mosquitos vetores de agentes de doença podem ser detetadas mais cedo e com maior precisão, permitindo um melhor controlo de surtos e uma maior proteção da população contra doenças.

O plano de trabalho do projeto VECTRACK tem como objetivo a colheita de diferentes espécies de mosquitos selvagens para análise com um protótipo de sensor ótico acoplado a uma armadilha para mosquitos em ambiente de laboratório. Os mosquitos identificados e categorizados em cinco variáveis (espécie, sexo, idade, tamanho e estado fisiológico) são colocados em gaiolas com as armadilhas equipadas com o sensor e cada captura que é feita pela armadilha é registada em tempo real. Cinco características fundamentais são extraídas de cada registo, correspondente ao voo de um mosquito, para produzir no final um conjunto de dados que vão ser usados no processo de

avaliação de cinco algoritmos de *machine learning* que vão servir para construir o modelo com melhor performance na identificação da espécie de mosquito testada (2,3).

Após a fase de *machine learning* em laboratório, testes de campo foram e estão a ser executados em paralelo com os vários parceiros de projeto, para demonstrar a eficácia do novo sistema de monitorização em ambiente operacional. Os sensores são configurados para o trabalho de campo e o acompanhamento do registo de dados é feito por uma aplicação *online Sandscape Hub*, com a classificação das amostras (mosquitos colhidos) e análise de dados em tempo real. Esta tarefa corresponde a uma fase de trabalho-piloto que tem como objetivo coletar periodicamente as amostras nos sacos de colheita das armadilhas de mosquito para contar e classificar todos os insetos para comparar com a contagem automática e classificação de amostras individuais pela tecnologia do sensor.

O mosquito invasor *Aedes albopictus* foi reportado pela primeira vez em Portugal em 2017 em dois locais distintos, numa empresa de pneus localizada no Norte, Penafiel (região do Porto) (4); e nas proximidades de um *resort* de golfe no Sul, região do Algarve (5). Desde então, sua presença tem sido reportada pelo REVIVE nos mesmos locais, bem como o aumento gradual da sua dispersão (6). A presença de *Ae. albopictus* em Portugal é uma grande ameaça à saúde pública, aumentando a preocupação com a introdução de várias arboviroses em Portugal continental ao nível previamente reconhecido na Ilha da Madeira. Na verdade, *Ae. aegypti* presente na Madeira desde 2005 (7), foi associado ao maior surto de dengue até agora relatado na Europa em 2012 (8). O reforço das ações de vigilância e monitorização de mosquitos vetores é essencial no nosso país.

_Objetivos

Neste trabalho faz-se a descrição dos protocolos aplicados no âmbito do projeto VECTRACK sobre: 1) os procedimentos laboratoriais, 2) as técnicas de campo para a colheita dos mosquitos a testar em laboratório, e 3) a instalação das primeiras “armadilhas inteligentes”. A análise preliminar dos dados coletados até ao momento é também apresentada.




_Materiais e métodos

Protocolos operacionais de campo para colheita de mosquitos no âmbito VECTRACK

A colheita de mosquitos para o processo operacional do projeto VECTRACK tem sido realizada desde maio de 2020. A seleção dos locais de amostragem foi efetuada de acordo com a espécie-alvo e estágio de vida. Alguns dos locais de colheita foram selecionados tendo em consideração os dados de diversidade e abundância das populações de mosquitos produzidos em 2019 pela REVIVE. O critério utilizado para definir o estágio de vida durante a amostragem foi dependente da espécie, uma vez que algumas são difíceis ou mesmo refratárias à reprodução com colonização da espécie em condições de insetário.

Colheitas de mosquitos adultos com armadilhas de luz tipo CDC com isco de dióxido de carbono em forma de gelo seco

Mosquitos adultos de espécies nativas foram capturados usando armadilhas luminosas tipo CDC (Centers for Disease Control – CDC-LT, J. W. Hock Co., Gainesville, FL, EUA), iscadas com 0,5-1 kg de gelo seco por um período mínimo de 12h (figura 1). As armadilhas foram colocadas ao final da tarde, cobrindo os períodos do pôr e do nascer do sol, 1,5 a 3 metros acima do solo, e coletadas na manhã

Figura 1:  Armadilha luminosa tipo CDC iscada com dióxido de carbono na forma de gelo seco.



do dia seguinte. O tempo de operação deste tipo de armadilha em campo é limitado pelo fornecimento de CO₂ ou pela capacidade da bateria (bateria de 6 V). As redes e/ou copos de colheita foram removidos após o período de amostragem e os mosquitos imediatamente transferidos para o laboratório.

Estas armadilhas para mosquitos são frequentemente usadas em programas de monitorização e são altamente eficazes na captura de fêmeas de mosquitos de muitas espécies que procuram hospedeiros para se alimentar de sangue quando são operadas com gelo seco ou outra fonte de CO₂. Quando a armadilha luminosa tipo CDC está corretamente configurada e as condições ambientais são favoráveis, os insetos capturados são coletados vivos. O uso destas armadilhas no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionado às espécies de mosquitos não-alvo *Culex theileri* e *Ae. caspius* e outros insetos da família Chironomidae.

Armadilha BG-Sentinel (Biogents) com isco BG lure e dióxido de carbono

Mosquitos adultos de espécies invasoras foram capturados usando armadilhas sentinela BG (BG-ST, Biogents, Regensburg, Alemanha), iscadas com BG lure e CO₂ por um período mínimo de 12h (figura 2). As armadilhas BG-ST foram instaladas em locais previamente definidos para a

Figura 2:  Armadilha BG sentinela iscada com dióxido de carbono na forma de gelo seco.





presença de espécies invasoras. Dado que essas armadilhas podem operar continuamente quando há energia elétrica, a periodicidade de colheita dos mosquitos pode variar de diária a uma vez por semana. No entanto, para coletar os mosquitos vivos, as inspeções devem ser realizadas diariamente.

As BG-ST são frequentemente utilizadas na monitorização de pontos de entrada, como aeroportos, portos, regiões de fronteira, empresas de pneus com comércio internacional e locais onde mosquitos invasores como *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* já tenham sido introduzidos e se encontrem estabelecidos localmente. Estas armadilhas foram projetadas especificamente para atrair estas espécies e geralmente são iscadas com um composto químico específico (BG-Lure ou Sweetscent). No entanto, se a BG-ST for iscada com dióxido de carbono (CO₂), a armadilha atrai uma ampla variedade de espécies de mosquitos, como *Culex* sp. e *Anopheles* sp., além de capturar mosquitos machos, fêmeas alimentadas com sangue e grávidas. O seu uso no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionado a uma ampla diversidade de espécies de mosquitos não-alvo, como *Cx. theileri* e as espécies-alvo *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.

Colheita de adultos em repouso com aspiradores

Mosquitos adultos de espécies não atraídas pelas armadilhas CDC-LT ou BG-ST foram capturados com aspiradores elétricos em paredes internas de abrigos de animais. As colheitas foram realizadas geralmente no período da manhã com um pequeno aspirador mecânico e uma lanterna elétrica para iluminar as superfícies. Mosquitos adultos em repouso ou em voo foram coletados por um período de 30 minutos em cada local. A utilização de aspiradores para recolha de mosquitos no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada para uma vasta gama de espécies de mosquitos não-alvo, como as espécies do género *Anopheles*, nomeadamente *An. atroparvus*.

Colheita de larvas com caços

O primeiro passo para a colheita dos estágios larvares do mosquito é a identificação dos habitats larvais e dos criadouros. Diferentes classes de habitats de larvas podem ser identificadas e a metodologia usada para a amostragem depende do tamanho e tipo do local do criadouro.

As larvas foram coletadas principalmente em 1) corpos de água temporários estagnados, como lagoas, pântanos, valas, canais, 2) corpos de água semipermanentes com vegetação, como pântanos e lagoas com vegetação e 3) recipientes artificiais, como pequenos contentores. Os criadouros foram amostrados com caços ou com rede de tamanho apropriado dependendo do tamanho e profundidade do corpo de água. Foram realizadas cinco a 20 imersões em cada local. As larvas coletadas no método de imersão foram primeiramente transferidas para uma bandeja branca e em seguida, com uma pipeta, transferidas para um frasco de 50 ml. A amostragem de larvas no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada para uma vasta gama de espécies de mosquitos não-alvo, como as espécies dos géneros *Culex* e *Culiseta*, nomeadamente *Cx. laticinctus*, *Cx. hortensis*, *Culiseta longiareolata* e outros insetos da família Chironomidae.

Colheita de ovos armadilhas de ovos – ovitraps

Para a colheita de ovos de mosquitos foram usadas *ovitraps*. As *ovitraps* foram instaladas em locais previamente definidos pela presença de espécies invasoras. Estas armadilhas não requerem energia e operam continuamente. As *ovitraps* consistem em um suporte de oviposição (geralmente papel de germinação em uma vara de madeira ou um pedaço de poliestireno) e um pequeno balde de plástico preto que é preenchido com água (0,5 a 1,5 litros) até dois terços. Foram realizadas inspeções semanais das *ovitraps*. Nas *ovitraps* com a presença de ovos de mosquito o papel de germinação ou suporte de madeira foi colocado em frascos de transferência e encaminhado ao laboratório para confirmação e contagem de ovos. O papel de germinação ou vara de madeira e a água são substituídos após a limpeza e manutenção das *ovitraps* (figura 3).



Figura 3: Exemplo de armadilha *ovitrap*s instalada no campo.



As *ovitrap*s são indicadas na monitorização de pontos de entrada, como aeroportos, portos, regiões de fronteira, empresas de pneus com comércio internacional e locais onde os mosquitos invasores *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* já foram introduzidos e estão estabelecidos localmente. A configuração de uma rede de *ovitrap*s é geralmente complementada com armadilhas BG-ST para monitorizar a abundância e distribuição de populações de mosquitos invasores. A utilização de *ovitrap*s no âmbito do projeto VECTRACK foi direcionada às espécies invasoras *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti*.

Manuseio e transporte de amostras de campo

Mosquitos adultos: os mosquitos coletados foram transportados para o laboratório nas bolsas coletoras ou transferidos para frascos de transporte por aspiração. Em ambos os métodos, os mosquitos foram mantidos refrigerados até à chegada ao laboratório. Os dados ambientais foram registados pelo inspetor de campo. No laboratório, os mosquitos foram identificados com recurso a chaves de identificação taxonómica. Os mosquitos vivos foram transferidos para uma gaiola-rede em ambiente insetário de 28°C, 70% de humidade relativa e fotoperíodo de 12h:12h.

Larvas: as larvas coletadas foram transportadas para o laboratório em frascos de colheita de 50 ml. As larvas foram identificadas através de chaves de identificação taxonó-

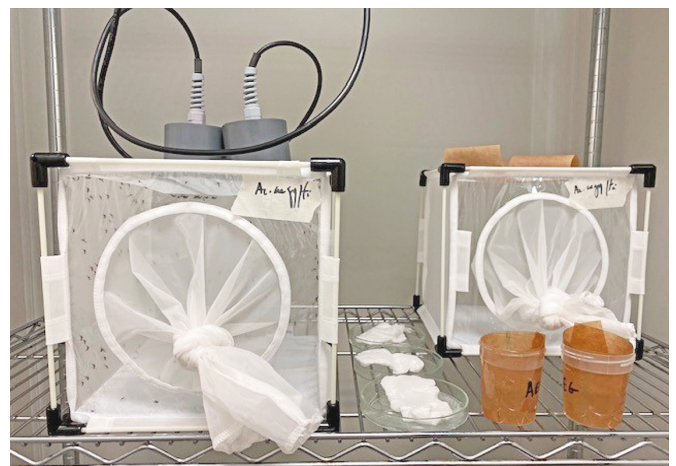
mica e separadas por espécie, local e data. Após identificação e triagem das espécies, as larvas foram transferidas para bandejas brancas de 60 cm X 30 cm e alimentadas com ração para peixes (TetraMin®) até à fase de pupa em condições de insetário (28°C). As pupas foram então transferidas para um frasco e colocadas em gaiolas-rede para a emergência dos adultos.

Ovos: suportes de oviposição coletados com ovos de *Aedes* spp. foram colocados num saco plástico fechado e transportados para o laboratório. Os ovos em cada suporte de oviposição foram contados e colocados em água em condições de insetário para permitir a eclosão das larvas.

Protocolos operacionais de laboratório para instalação e gestão de colónias de mosquitos no âmbito VECTRACK

As espécies de mosquito que são capazes de se instalar em condições de insetário foram estabelecidas em colónias de laboratório. Os adultos das espécies-alvo *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* foram mantidos em gaiolas de 30 x 30 x 30 cm num insetário privado de luz natural, sob condições padrão e constantes de 28°C ± 1°C, e 70 ± 5% de humidade relativa, 12h:12h fotoperíodo claro: escuro incluindo os períodos de transição crepúsculo (1h) e amanhecer (1h) (figura 4).

Figura 4: Colónia de *Aedes aegypti* em ambiente de insetário, com dispositivo Hemotek para alimentação dos mosquitos com sangue e copos preparados para a ovipostura.





Uma solução de sacarose (10%) foi fornecida aos mosquitos adultos. Sangue bovino fresco desfibrinado foi fornecido a mosquitos fêmeas duas vezes por semana usando o sistema de alimentação por membrana da Hemotek (*Discovery Workshop*, Inglaterra) (figura 5). As fêmeas foram deixadas para colocar os ovos num copo cilíndrico de plástico preenchido com 1/3 com água e forrado com papel de germinação.

A eclosão dos ovos foi estimulada usando água destilada fervida e depois arrefecida em frascos com água a 3/4 (figura 6). As larvas eclodidas foram transferidas para bandejas brancas em número pré-determinado de acordo com

Figura 5: Alimentação de sangue usando o sistema de alimentação por membrana Hemotek (*Discovery Workshop*, Inglaterra).



Figura 6: Protocolo de incubação de ovos.



as condições de desenvolvimento e alimentadas com ração para peixes suplementada com levedura de cerveja. Após 5-7 dias, as pupas foram transferidas para gaiolas de rede.

_Resultados

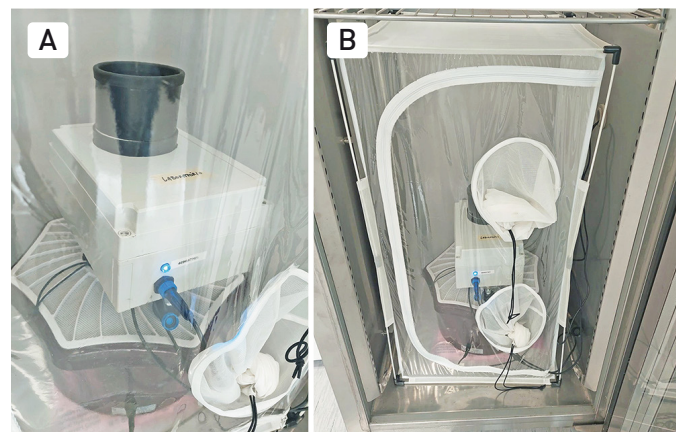
Resultados dos ensaios de Laboratório

Um total de 10621 mosquitos, pertencentes a sete espécies, foram testados, resultando em 227 testes realizados no protótipo do sensor bioacústico desenvolvido pela IRIDEON (figura 7a e 7b).

As espécies foram divididas duas categorias: espécies-alvo (*target species*), que incluem *Ae. albopictus* (4015 mosquitos testados), *Ae. aegypti* (4170 mosquitos testados) e *An. gambiae* (857 mosquitos testados), espécies estas que são as principais espécies vetoras de arbovírus e parasitas importantes em saúde pública; e espécies não-alvo (*non-target species*), que incluem *Cs. longiareolata* (989 mosquitos testados), *Cx. theileri* (390 mosquitos testados), *Cx. laticinctus* (189 mosquitos testados) e *Cx. hortensis* (11 mosquitos testados), espécies não invasoras no território nacional.

Os testes para as espécies-alvo foram realizados utilizando duas densidades larvares diferentes (50 larvas por litro e

Figura 7: A - Sensor bioacústico criado pela IRIDEON para a identificação de mosquitos B - Sensor montado numa armadilha BG Mosquitair dentro da câmara climática onde são feitos os testes.





250 a 300 larvas por litro), quatro temperaturas distintas (18, 23, 28 e 33°C), com dois intervalos de idade para os machos (2-4 e 7-9 dias de idade) e três intervalos de idade para as fêmeas (2-4, 7-9 e 14-16 dias de idade).

Para *Ae. albopictus* foi possível adquirir voos suficientes para a criação de conjunto de dados equilibrado para *machine learning*. Para *Ae. aegypti* existem categorias (nomeadamente os testes a temperatura de 18º) onde é necessário obter mais voos, mas prevê-se que estejam todos adquiridos até outubro de 2022. Quanto a *Anopheles gambiae* não irá ser possível fazer mais ensaios dos que os já realizados uma vez que estes requerem a presença de um sensor na Guiné-Bissau, o que não vai ser possível por uma questão logística no período em que decorre o projeto.

Os testes para as espécies não-alvo foram realizados com critérios mais simples, sendo apenas utilizada uma densidade larvar (200 larvas por litro) e uma temperatura (23°C), sendo os intervalos de idades quer para os machos quer para as fêmeas iguais às das espécies-alvo. O número reduzido de voos para algumas destas espécies deve-se a serem pouco comuns nas capturas do REVIVE, limitando assim a realização de mais testes. Contudo, prevê-se que seja possível obter todos os voos necessários para uma análise de dados equilibrada até ao final do projeto.

Os resultados preliminares deste trabalho indicam a capacidade de o sensor conseguir distinguir machos de fêmeas com mais de 99% de fiabilidade e de distinguir os diferentes géneros de mosquitos com mais de 90% de fiabilidade.

_Discussão e conclusões

A necessidade de prevenir e controlar as doenças transmitidas por vetores, e em especial mosquitos, é amplamente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que desenvolveu uma estratégia para fortalecer o controlo de vetores a nível mundial até 2030 (9). Uma das metas não alcançadas do programa *Global Vector Control Response 2017-2030* (GVCR) era que 50% dos países completassem em 2020 uma avaliação das necessidades de controlo de vetores (meta atingida apenas por 27% dos países), sendo uma das fragilidades mais importantes apontadas a falta de

capacidade entomológica. Os desafios enfrentados pelos países da região do mediterrâneo, com a presença de mosquitos invasores do género *Aedes* são destacados, sendo essencial o aumento das ações de vigilância, monitorização e controlo, com o envolvimento integrado da comunidade (10). A implementação de um sistema de vigilância em tempo real com os sensores desenvolvidos no âmbito do projeto VECTRACK será uma mais-valia de grande impacto para atingir as metas propostas pelo GVCR.

Com o avanço destes métodos e tecnologia, irá ser possível monitorizar os pontos de entrada de um país, como portos, aeroportos, fronteiras e algumas indústrias, para deteção de espécies invasoras do género *Aedes* em tempo real, melhorando em grande parte o tempo de resposta, de maneira a prevenir a disseminação e instalação destas espécies de vetores de arbovírus, como dengue, Zika e chikungunya, e a mitigação do seu impacto em saúde pública.

Referências bibliográficas:

- (1) Osório HC, Zê-Zê L, Amaro F, et al. Mosquito surveillance for prevention and control of emerging mosquito-borne diseases in Portugal – 2008-2014. *Int J Environ Res Public Health*. 2014 Nov 12;11(11):11583-96. <https://doi.org/10.3390/ijerph11111583>
- (2) González-Pérez MI, Faulhaber B, Williams M, et al. A novel optical sensor system for the automatic classification of mosquitoes by genus and sex with high levels of accuracy. *Parasit Vectors*. 2022 Jun 6;15(1):190. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05324-5>
- (3) González MI, Encarnação J, Aranda C, et al. 11. The use of artificial intelligence and automatic remote monitoring for mosquito surveillance. In: Gutiérrez-López R, Logan JG, Martínez-de la Puente J (eds). *Ecology of diseases transmitted by mosquitoes to wildlife*. Wageningen Academic Publishers, 2022, pp. 211-223. (*Ecology and Control of Vector-borne Diseases*; 7). https://doi.org/10.3920/978-90-8686-931-2_11
- (4) Osório HC, Zê-Zê L, Neto M, et al. Detection of the Invasive Mosquito Species *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Diptera: Culicidae) in Portugal. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Apr 21;15(4):820. <https://doi.org/10.3390/ijerph15040820>
- (5) Marabuto E, Rebelo MT. The Asian tiger mosquito, *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse), a vector of dengue, chikungunya and zika viruses, reaches Portugal (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*. 2018 Apr 20;4413(1):197-200. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4413.1.10>
- (6) Osório HC, Zê-Zê L, Amaro F, et al. REVIVE 2021 – Culicídeos. In: Relatório REVIVE 2021 – Culicídeos e Ixodídeos: Rede de vigilância de vetores. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2022, pp. 7-31. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/8004>
- (7) Margarita Y, Grácio AJ, Lencastre I, et al. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) in Madeira Island – Portugal. *Acta Parasitol Port*. 2006;13:59-61.
- (8) European Centre for Disease Prevention and Control. Dengue outbreak in Madeira, Portugal, March 2013. Stockholm: ECDC, 2014. <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/dengue-madeira-ECDC-mission-2013.pdf>



artigos breves_ n. 1

- (9) World Health Organization. Global vector control response 2017-2030: A strategic approach to tackle vector-borne diseases. Geneva: WHO, 2017.
<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-GVCR-2017.01>
- (10) World Health Organization. Genuine intersectoral collaboration is needed to achieve better progress in vector control. Geneva: WHO, 2022.
<https://www.who.int/news/item/11-04-2022-genuine-intersectoral-collaboration-is-needed-to-achieve-better-progress-in-vector-control>