Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

پرورش انبوه آنوفل استفنسی به روش تغذیه مصنوعی با استفاده از خون انسان در شرایط آزمایشگاهی

حسن نصیریان [1] دکتر حسین لدنی [2] عباس پودات [3]

[1] کارشناس ارشد حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، [2] استاد گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی تهران [3] مربی گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان

مجله پزشکی هرمزگان سال دوازدهم شماره سوم پاییز 87 صفحات 142-137

چکیده

مقدمه: *به منظور کنترل بیماریهایی که از طریق ناقلین به انسان و دام منتقل می شوند، به تحقیقات زیادی جهت شناسایی ناقل و روشهای مبارزه با آن نیاز می باشد. این تحقیقات با پرورش کلنی‌های آزمایشگاهی ناقلین مالاریا، لیشمانیوز و دیگر بندپایان خونخوار امکان‌پذیر خواهد بود. هدف از انجام این مطالعه، پرورش انبوه آنوفل استفنسی به روش تغذیه مصنوعی با استفاده از خون انسان در انسکتاریوم ناقلین مالاریای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده است.*

روش کار: *به منظور تغذیه مصنوعی آنوفل استفنسی ، دستگاهی که از اجزای ترموستات دیجیتالی با سنسور، المنت، کنتاکتور و یک عدد آهن‌ربا تشکیل شده بود، تهیه گردید. غشاء مصنوعی مورد استفاده پارافیلم **"M"** و خون مورد استفاده خون کامل انسان بود. خون در داخل درب نوشابه‌ای که روی آن با پارافیلم **"M"** پوشانده شده بود بر روی سطح قفس قرار داده می‌شد، بطور غیر مستقیم با المنت گرم می‌گردید و سپس در دمای ثابت $37^{\circ}C$ مورد تغذیه آنوفل استفنسی قرار می‌گرفت.*

نتایج: *در این مطالعه آنوفل استفنسی طی سه نسل متوالی بدون حضور میزبان زنده در شرایط آزمایشگاه، به روش تغذیه مصنوعی با خون انسان پرورش داده شد. درصد خونخواری پشه‌ها بین 47/7% تا 64% و میانگین دفعات خونخواری و تخم‌ریزی ماده‌ها بترتیب 10 و 9 بار بود. در طول مدت پرورش، لاروها فاقد مرگ و میر بوده و کلیه پوپ ها به حشره بالغ تبدیل شدند. درصد جنسیت 51/6% نر و 48/4% ماده بود که اختلاف معنی‌داری بین تعداد پشه نر و ماده در سه نسل پشه پرورش داده شده مشاهده نشد ($P<0/05$). میانگین طول عمر پشه‌های ماده 39-35 روز بود. نسبت جمعیت نسل دوم و سوم، به ترتیب معادل 6 و 25 برابر نسل اول بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج این بررسی نشان داد که با استفاده از این روش، در کوتاه مدت می‌توان آنوفل استفنسی را در شرایط آزمایشگاه بدون حضور میزبان زنده به صورت انبوه پرورش داد و زمینه مناسبی را برای مطالعه عوامل مربوط به حشره و انگل فراهم نمود.*

کلیدواژه‌ها: *تغذیه مصنوعی - خون انسان - آنوفل استفنسی - پرورش انبوه*

نویسنده مسئول:
حسن نصریان
دانشکده بهداشت – دانشگاه علوم پزشکی تهران
تهران - ایران
تلفن: 88951393 21 98+
پست الکترونیکی:
hanasirian@yahoo.com

دریافت مقاله: 84/3/29 اصلاح نهایی: 85/3/2 پذیرش مقاله: 87/2/12

مقدمه:

به منظور کنترل بیماری‌هایی که از طریق ناقلین به انسان و دام منتقل می‌شوند، به تحقیقات زیادی جهت شناسایی ناقل و روش‌های مبارزه با آن نیاز می‌باشد. این تحقیقات با پرورش کلنی‌های آزمایشگاهی ناقلین مالاریا، لیشمانیوز و دیگر بندپایان خونخوار امکان‌پذیر خواهد بود. از آنجا که تحقیقات و برنامه‌های کنترل بیولوژیک در حال گسترش می‌باشند، نیاز به تکنیک‌های

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

پرورش بندپایان افزایش یافته است. محققان در سرتاسر دنیا تجربیات ارزشمندی برای پرورش انبوه حشرات به دست آورده‌اند و تحقیقات در این زمینه اکنون نیز ادامه دارد. بهبود تکنیک‌های خوندهی کلنی بندپایان، تداوم بقا، تولید تخم و پرورش نسل‌های متوالی گونه‌های مختلف حشرات خونخوار را بدنبال دارد. یکی از این تکنیک‌ها استفاده از حیوانات زنده می‌باشد. استفاده از حیوانات برای انبوه‌سازی حشرات خونخوار، پرخرج، نامناسب و از نظر سلامت حیوانات غیرقابل قبول می‌باشد (1).

از روش‌های تغذیه مصنوعی به منظور پرورش بندپایان خونخوار، بویژه آنها که میزبان طبیعیشان در دسترس نمی‌باشد یا قابل نگهداری در حیوان خانه نیستند مثل شپش بدن انسان **(Pediculus humanus corporis)**، کنه **Ixodes holocyclus** و مگس تسه تسه **(Glossina tarsalis)** استفاده می‌شود (5-2). همچنین به منظور آلوده‌سازی گونه‌های مختلف بندپایان خونخوار با عوامل مختلف بیماری‌زا، از کرم‌های انگلی، ویروس‌های بیماری‌زا و تعیین پتانسیل انتقال آنها (10-6)، خوراندن مواد رادیواکتیو مختلف به پشه‌ها یا سایر بندپایان خونخوار (11)، جمع‌آوری مواد مترشحه از بندپایان مختلف (14-12)، بررسی داروهای ضد مالاریا بر روی سیکل جنسی انگل در بدن پشه‌ها (6)، ارزیابی دورکننده‌های شیمیایی (13) و سطح حساسیت بندپایان نسبت به سموم (15) استفاده می‌شود.

از اوایل قرن بیستم تاکنون در سراسر دنیا در زمینه تغذیه مصنوعی حشرات خونخوار، دستگاههای ساده تا پیچیده‌ای ابداع شده و مورد استفاده قرار گرفته است که پیشرفته‌ترین آن توسط **Cosgrove** و همکارانش ساخته شده است (17 ،16 ،6). **Kasap** و همکاران در ترکیه به منظور تغذیه مصنوعی **An. sacharovi** بر روی خون انسان که از قبل تهیه شده بود، سه نوع غشاء پلاستیکی، پارافینی و روده گوساله را مورد استفاده قرار دادند. تغذیه **An. sacharovi** بر روی غشاء تهیه شده از روده گوساله با بهترین نتیجه همراه بود. میزان خونخواری 50/5%-44/4% بود که در مقایسه با خونخواری بر روی خرگوش زنده (35%) بیشتر بود (18).

شاکری در زمینه تغذیه مصنوعی **(Lis.)** آنوفل استفنسی در ایران با ابداع دستگاهی که از اجزای یک قطعه استوانه‌ای شکل از جنس پولیکا، بخش تغذیه و المنت تشکیل شده بود با استفاده از خون مرغ و غشاء نسکوفیلم، میزان خونخواری آنوفل استفنسی را 26/6% گزارش نمود (19). اکبرزاده دستگاهی متشکل از یک استوانه از جنس آلومینیوم، المنت، ترموستات و محفظه غذایی تهیه و با استفاده از پوست جوجه یک روزه میزان خونخواری آنوفل استفنسی را نسبت به خون فیبرین‌زدایی شده گوسفند، خون سیتراته گوسفند، خون فیبرین‌زدایی شده مرغ و خون سیتراته مرغ مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که آنوفل استفنسی بیشترین میزان خونخواری را در ارتباط با خون فیبرین‌زدایی شده گوسفند داشته (65%) و در مقایسه با خونخواری طبیعی، اختلافی معنی‌داری (خونخواری از خوکچه هندی) نداشت. کمترین میزان خونخواری مربوط به خون سیتراته گوسفند بود (46/6%). لازم به یادآوری است که این نتایج تنها در یکبار تغذیه آنوفل استفنسی از خلال غشاهای یاد شده حاصل شده است (20).

هدف از انجام این مطالعه، پرورش انبوه آنوفل استفنسی به روش تغذیه مصنوعی با استفاده از خون انسان در انسکتاریوم ناقلین مالاریای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بوده است.

روش کار:

در این تحقیق از تخم گرفته شده از آنوفل استفنسی سوش هندی انسکتاریوم پشه‌های گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از خون انسان به منظور خونخواری پشه‌های ماده، بطور متوالی پشه تولید گردید.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

به منظور تغذیه مصنوعی آنوفل استفنسی، دستگاهی که از اجزای ترموستات دیجیتالی با سنسور (دامنه دما از 50- تا 150+ °C)، المنت کوچک، کنتاکتور کوچک (ولتاژ 240-220 ولت و شدت جریان 60 هرتز) و یک عدد آهن‌ربا تشکیل شده بود، تهیه گردید. غشاء مصنوعی به کار گرفته شده پارافیلم **"M"** و خون مورد استفاده، خون کامل انسان **(Whole Blood)** بود که توسط بانک خون به شیوه استریل تهیه گردیده بود. این خون در دمای 8 – 4 °C یخچال نگهداری می‌گردید.

جهت انجام مطالعات، تعداد 45 پشه نر و 40 پشه ماده خالی آنوفل استفنسی درون یک قفس به ابعاد 30 ×30 ×30 سانتیمتر قرار داده شدند. سپس جهت انجام تغذیه مصنوعی، خون درون سه عدد درب نوشابه معمولی به قطر 3 سانتیمتر ریخته و سطح آن با پارافیلم **"M"** (با کشیدگی حدود 2 برابر ابعاد اولیه) پوشانده شد. محفظه‌های خونی به طور وارونه بر روی سطح قفس قرار گرفت و با آهن‌ربایی که درون بشر 400 سی‌سی (محتوی بشر 100 سی سی با آب و المنت) قرار داشت جذب می‌شد. پس از اتصال دستگاه به برق و گرم شدن آب، گرما به خون انتقال می‌یافت. با تنظیم ترموستات در دمای 37 °C و نصب کنتاکتور در مسیر مدار، از نوسان دما جلوگیری گردید. خوندهی دو بار در هفته (روزهای شنبه و سه‌شنبه) انجام می‌شد و مدت زمان خونخواری 2 ساعت طول می‌کشید. پشه‌ها اغلب در دقایق اولیه به خون جلب شده و خونخواری می‌کردند. پس از پایان مدت خونخواری، جهت تغذیه نرها، آب قند 10% و جهت جمع آوری تخم‌ها یک عدد ظرف محتوی آب به قفس اضافه می‌گردید. پس از تخم‌ریزی، تخم‌ها به ظروف پرورش لارو به همراه مشخصات لازم انتقال داده می‌شد.

پس از تفریخ تخم‌ها، لاروها در محیط انسکتاریوم در درجه حرارت 25 ± 3 °C و رطوبت نسبی 70-60% پرورش داده شدند. در این شرایط درجه حرارت آب حدود 22 °C بود. لاروها از مرحله دوم لاروی با پودر بماکس (**Bemax**) تغذیه گردیده، پس از طی مراحل لاروی و تشکیل شفیره، شفیره‌ها هر روز صبح به وسیله پوآر جمع‌آوری می‌شد و جهت خروج پشه بالغ به درون قفس‌های به ابعاد 30×30×30 سانتیمتر به همراه مشخصات لازم انتقال می‌یافت. در طول مدت انجام مطالعه، سن پشه‌های ماده (به روز)، تعداد پشه خون خورده، دفعات تخم‌ریزی، تعداد لارو زنده، تعداد لارو مرده، تعداد پوپ، تعداد پشه بالغ تولید شده (نر و ماده) با مشاهده روزانه شمارش و در جداولی که از قبل تهیه شده بود یاداشت می‌شد.

درصد خونخواری در یک نسل و میانگین خونخواری پشه‌های ماده در طول عمرشان محاسبه شد. این در حالی است که با افزایش طول عمر، میزان خونخواری پشه‌ها کاهش می‌یابد؛ به همین منظور درصد خونخواری در 20 روز اول طول عمر ماده‌ها نیز محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و بهره‌گیری از نرم‌افزار **SPSS-11.5** انجام گرفت.

نتایج:

بدین ترتیب طبق مراحل زیر از تخمِ گرفته شده از کلنی مادر، سه نسل متوالی آنوفل استفنسی و تخم نسل سوم که در صورت ادامه پرورش، نسل چهارم حاصل می‌گشت، به روش تغذیه مصنوعی با خون انسان پرورش انبوه داده شد:

تخم گرفته شده از کلنی مادر ← طی نمودن مراحل لاروی ← شفیره ← آنوفل بالغ ← تخم

نتایج حاصل از این مطالعه به این صورت بود که در نسل اول، 85 عدد پشه بالغ تولید شد که از این تعداد، 45 عدد نر و 40 عدد ماده بودند. در نسل دوم، 515 عدد پشه بالغ تولید شد که از این تعداد 280 عدد نر و 235 عدد ماده بودند. در نسل سوم تعداد 2190 پشه بالغ تولید شد که از این تعداد 1129 عدد نر و 1061 عدد ماده بودند. به طور کلی در طی سه نسل متوالی پرورش انبوه آنوفل استفنسی،2790 پشه تولید شد که از این تعداد 1439 عدد نر و 1351 عدد ماده و درصد جنسیت 51/6% نر و 48/4% ماده بود و اختلاف معنی‌داری بین تعداد پشه

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

نر و ماده در سه نسل پشه پرورش داده شده مشاهده نشد (**P**<0/05). در طول انجام این مطالعه، مرگ و میر در بین لاروها مشاهده نشد. تمامی شفیره‌ها به حشره بالغ تبدیل شدند (جدول شماره 1).

جدول شماره 1- نتایج حاصل از تغذیه مصنوعی آنوفل استفنسی بر روی خون انسان در انسکتاریوم

نسل	اول			دوم			سوم		
	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده	کل	نر	ماده
تعداد	85	45	40	515	280	235	2190	1129	1061
نر به ماده	-	1/1:1		-	1/1:2		-	1/1:1	

همانطور که در جدول شماره 2 مشاهده می‌شود، میانگین طول عمر ماده‌های بالغ در نسل اول 35، نسل دوم 38/7 و در نسل سوم 39 روز می‌باشد. میانگین دفعات تغذیه و تخم‌ریزی بترتیب 10 و 9 بار در هر سه نسل پرورش انبوه بود. ماده‌ها در تمام طول عمر در نسل اول 64%، در نسل دوم 44/44% و در نسل سوم 47/71%، و در 20 روز اول طول عمر در نسل اول 80/6%، در نسل دوم 67/9% و در نسل سوم 68/5% خونخواری داشتند.

جدول شماره 2- شاخص‌های اندازه‌گیری شده ماده‌های بالغ در طول مدت مطالعه

نسل	اول	دوم	سوم
میانگین طول عمر به روز	35	38/7	39
میانگین دفعات تغذیه	10	10	10
میانگین دفعات تخم‌ریزی	9	9	9
درصد خونخواری در تمام طول عمر	64	44/44	44/71
درصد خونخواری در 20 روز اول طول عمر	80/6	67/9	68/5

بحث و نتیجه‌گیری:

در مطالعات انجام شده توسط شاکری و اکبرزاده، درصد خونخواری آنوفل استفنسی به ترتیب 26/6% و 65% در یکبار تغذیه مصنوعی بود (19، 20) در صورتی که در مطالعه اخیر طی سه نسل پرورش متوالی آنوفل استفنسی بدون حضور میزبان زنده در شرایط آزمایشگاهی به روش تغذیه مصنوعی با استفاده از خون انسان، درصد خونخواری پشه‌ها 47/7% تا 64% بوده است. در مطالعه ای که **Kasap** و همکاران بر روی تغذیه **Anopheles sacharovi** بر روی روده گوساله انجام دادند میزان خونخواری **Anopheles sacharovi**، 50/5-44/4% بود (18).

نتایج این بررسی نشان داد که با استفاده از این روش در کوتاه مدت می‌توان آنوفل استفنسی را در شرایط آزمایشگاه، بدون حضور میزبان زنده و به صورت انبوه پرورش داد و زمینه مناسبی برای مطالعات عوامل مربوط به حشره و انگل فراهم نمود.

در حال حاضر در دنیا از روش‌های تغذیه مصنوعی به منظور نگهداری و ادامه نسل، اثر رادیوایزوتوپ‌ها، مقایسه روش‌های مختلف تغذیه مصنوعی بر روی غشاءهای متفاوت، تاثیر پاتوژنها و عوامل بیماری‌زا و غیره بر روی ناقلان خونخوار منتقل کننده عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است (22، 29). در مطالعه‌ای که اخیراً به انجام رسید، اثر عصاره گیاه نیم **(Azadirachta indica A. Juss, Meliaceae)** به روش تغذیه مصنوعی بر روی میزان خونخواری، تخم‌گذاری و ساختمان اووسیست در آنوفل استفنسی آلوده به انگل مالاریا مورد بررسی قرار گرفته است (30).

سپاسگزاری:

بدینوسیله از همکاری صمیمانه آقای مهندس عبائی رئیس محترم انسکتاریوم ناقلین مالاریا و سرکار خانم رفیع کارشناس حشره‌شناسی گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

References منابع

1. Blackwell A, Mellor PS, Mordue W. Laboratory feeding of Culicoides impunctatus (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. *J Med Entomol*. 1994;31(2):302-5.
2. Hagen HE, Grunewald J. Routine blood-feeding of Aedes aegypti via a new membrane. *J Am Mosq Control Assoc*.1990;6(3):535-6.
3. Haddon WJ. The maintenance of the human body louse Pediculus humanus corporis through complete cycles of growth by serial feeding through artificial membranes. *Am J Trop Med Hyg*. 1956;5(2):326-30.
4. Stone BF, Commins MA, Kemp DH. Artificial feeding of the Australian paralysis tick, Ixodes holocyclus and collection of paralysing toxin. *Int J Parasitol*. 1983;13(5):447-54.
5. Mews AR, Baumgartner H, Luger D, Offori ED. A preliminary report on the establishment of a G. morsitans orientalis Vanderplank colony fed on membranes with rabbit supplement. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1973;67(2):291-2.
6. Gerberg EJ, Kutz FW. A large-scale artificial feeding technique for infecting mosquitoes and its application to screening antimalarial chemicals. *J Med Entomol*. 1971;8(5):610-2.
7. Fahrner J, Vankan D, Schulz-Key H. Ingestion of microfilariae from different sources by Culicoides nubeculosus (Diptera: Ceratopogonidae) through an artificial membrane. *Vet Parasitol*. 1988;28(4):315-20.
8. Mellor PS. A membrane feeding technique for the infection of Culicoides tuberculosus Mg. and Culocoides variipennis sonorensis Cog. with Onchocerca cervicalis. *Rail Henry Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1971;65(2):199-201.
9. Failloux AB, Chanteau S, Chungue E, Loncke S, Sechan Y. Oral infection of Aedes polynesiensis by Wuchereria bancrofti by using parafilm membrane feeding. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991;7(4):660-2.
10. Jennings M, Boorman J. Laboratory infection of the sandfly Phlebotomus papatasi Scopoli (Diptera, Psychodidae) with three Phleboviruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(1):62-4.
11. Friends WG, Hewson RJ. A small volume thermostatically controlled apparatus for feeding radioactive diets to mosquitoes and other sucking arthropods. *Mosq News*. 1978;38(4):536-41.
12. Lensen A, Van Druten J, Bolmer M, Van Gemert G, Eling W, Sauerwein R. Measurement by membrane feeding of reduction in Plasmodium falciparum transmission induced by endemic sera. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1996;90(1):20-2.
13. Bernardo MJ, Cupp EW. Rearing black flies (Diptera: Simuliidae) in the laboratory: mass-scale in vitro membrane feeding and its application to collection of saliva and to parasitological and repellent studies. *J Med Entomol*. 1986;23(6): 666-79.
14. Ponnudurai T, Lensen AH, Van Gemert GJ, Bolmer M, Van Belkum, A, Van Eerd P, Mons B. Large-scale production of Plasmodium vivax sporozoites. *Parasitol*. 1990;101:317-20.
15. Mullens BA. In vitro assay for permethrin persistence and interference with bloodfeeding of Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) on animals. *J Am Mosq Control Assoc*. 1993;9(3):256-9.
16. Cosgrove JB, Wood RJ, Petric D, Evans DT, Abbott RH. A convenient mosquito membrane feeding system. *J Am Mosq Control Assoc*. 1994;10(3):434-6.
17. Rutledge LC, Ward RA, Gould DJ. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq News*. 1964;24:407–19.
18. Kasap H, Alptekin D, Kasap M, Guzel AI, Luleyap U. Artificial blood feeding of Anopheles sacharovi on a membrane apparatus. *J Am Mosq Control Assoc*. 2003;19(4):67-370.
19. Shakery M. Two new experiment instruments for rapid sexing of pupae and membrane feeding of adult mosquitoes (Diptera: Culicidae) [M.S.P.H. dissertation]. Tehran University of Medical Sciences: 1979;922.

Downloaded from hmj.hums.ac.ir at 20:40 +0330 on Tuesday January 16th 2018

20. Akbarzade K. Stury of Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae) in comparison different artifitial methods with natural feeding and presentational the best applied method for using in insectary. [M.S.P.H. dissertation]. Tehran University of Medical Sciences: 1998;2680.

21. Akbarzadeh K, Ladonni H, Shaeghi M. Introducing a protable apparatus for artificial feeding of Anopheles stephensi. *Iran J Publ Health*. 2001;21:21-30.

22. Goffredo M, Romeo G, Savini G, Monaco F, Gennaro A di. Laboratory survival and blood feeding response of wild-caught Culicoides obsoletus Complex (Diptera: Ceratopogonidae) through natural and artificial membranes. *Veterinaria Italiana*. 2004;40(3):282-5.

23. Kirch HJ, Teel PD, Kloft WJ, Deloach JR. Artificial feeding of Ornithodoros concanensis (Acari: Argasidae) nymphs on bovine blood and morphological changes in erythrocytes undergoing hemolysis in the tick midgut. *J Med Entomol*. 1991;28(3):450-5.

24. Kogan PH. Substitute blood meal for investigating and maintaining Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 1990;27:709-12.

25. Mishra K, Kumar Raj D, Hazra RK, Dash AP. A simple, artificial-membrane feeding method for the radio-isotope labelling of Aedes aegypti polypeptides in vivo. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005;99:803-6.

26. Mourya DT, Gokhale MD, Barde PV, Padbidri VS. A simple artificial membrane-feeding method for mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2000;94:460.

27. Novak MG, Berry WJ, Rowley WA. Comparison of four membranes for artificially bloodfeeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc*. 1991;7:327-9.

28. Scholte EJ, Knols BG, Takken W. Infection of the malaria mosquito Anopheles gambiae with the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae reduces blood feeding and fecundity. *J Invertebr Pathol*. 2006;91:43-9.

29. Tseng M. A simple parafilm M-based method for blood-feeding Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2003;40(4):588-9.

30. Lucantoni L, Giusti F, Cristofaro M, Pasqualini L, Esposito F, Lupetti P, et al. Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae). *Tissue Cell*. 2006;38(6):361-71.