

計畫編號：DOH94-DC-2015

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

台灣地區矮小瘧蚊棲息場所及吸血源的研究

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：鄧華真

研究人員：陳永成、張梅君

執行期間： 94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見*

前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等。

台灣 54 年正式列入瘧疾根除地區 (Anonymous 1991) 後，近 40 年沒有本土病例發生，僅每年均有境外移入病例 5-43 例，但確於 92 年 8 月在台東縣發生兩例介入病例，病例為間日瘧及熱帶瘧混合感染。瘧原蟲在人體的潛伏期依瘧原蟲種類而有不同，為 11-28 天。目前國人出國前往瘧疾疫區觀光旅遊做生意的頻率很高，尤其是大陸、索羅門島等流行地區。台灣瘧疾根除後，大多數的醫生並沒有診斷瘧疾的經驗 (例如榮總醫院於民國 86 年的感染事件，造成六人死亡)，境外移入之病例分散各地，資料顯示這些病例由發病到確診尚需一段時間，而且間日瘧很難治愈，容易複發。病情輕微者也可能在尚有矮小瘧蚊孳生地活動，原住民有夜宿於院子的習性，一旦瘧原蟲傳給當地之瘧蚊 (本局於 93 年 6 月曾有一晚捕獲 198 隻雌蚊的紀錄)，則有再度發生本土性病例之可能。

在早期台灣有瘧疾發生之時期，矮小瘧蚊之足跡遍布台灣南北各地之水稻田、灌溉溝渠及溪流，而其密度與水稻耕作時期關係密切 (Anonymous 1991)。而後台灣地區因農業轉型及山坡地開發的結果，矮小瘧蚊孳生地被破壞或改變，本所於八十年至八十二年之全面性調查 (全省每個鄉鎮選二個村里)，發現矮小瘧蚊幼蟲僅發現於台南縣、高雄縣、屏東縣、台東縣、花蓮縣之 22 個鄉鎮，而其孳生地為灌溉溝渠及溪流。於八十五年六月至八十六年七月，針對發現矮小瘧蚊孳生附近之村里進行幼蚊及成蚊調查，再次將孳生範圍修訂為 19 鄉鎮 41 村里 (病媒及昆蟲病組 1998)，92 年因應介入病例前往台東縣太麻里鄉及大武鄉調查，發現金崙村及大鳥村皆有矮小瘧蚊孳生，孳生源範圍增訂為 21 鄉鎮 43 村里。另外，於八十三年七月至八十四年六月於發現矮小瘧蚊之縣市，各選一個密度較高之地點，研究季節性消長及孳生地之水質。發現各地區之幼蟲密度以台南縣新化鎮、屏東縣及台南縣較高及種類較單純，而全年之密度於九月開始至第二年之三月，因水位較穩定而較高 (Teng et al. 1998)。

台灣早期矮小瘧蚊因為具有吸食人血的喜好 (69.2%)、棲息於住家的習性及自蚊蟲體內檢出高帶瘧原蟲率 (最高達 0.3%)，而列為台灣傳播瘧疾的主要病媒，也可能是唯一的病媒蚊 (Anonymous 1991)，依據早期資料顯示矮小瘧蚊白天較棲息於室內，58% 發現於臥室、儲藏室佔 23%、客廳 10%、廚房 7%，其他地區佔 1.5%；室外多棲息於牆壁之下角隙縫內，以及草束間。但最近的調查顯示，矮小瘧蚊密度很低，主要孳生於台南縣、臺東縣、屏東縣、高雄縣及花蓮縣等地區 (21 個鄉鎮 42 個村里) 山腳下緩流的小溪，遠離人群，研究瘧蚊棲息的場所及分析瘧蚊吸血源的種類，可以提供資訊了解台灣各地區瘧疾複發的可能機會及疾病管制局瘧疾防治政策的參考。

鑑定吸血源的方法有血清學及 PCR 兩種方法，其中血清學方法包括早期使用的 precipitin tests，螢光抗體技術 fluorescent antibody technique (FA)，被動凝血抑制技術 the passive hemagglutination inhibition technique (PHI)，及可偵測至寄種種類且目前有用的酶免疫技術 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Washino & Tempelis 1983, Rattanarithikul et al. 1996,

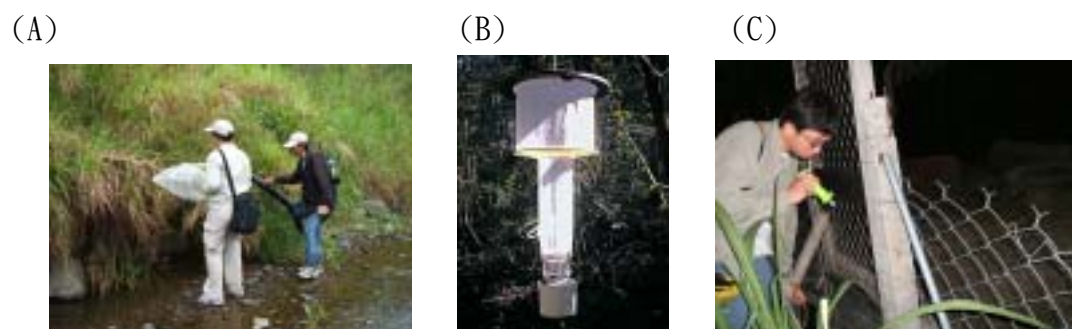
Mukabana et al. 2002)。雖然血清檢驗方法可用來檢驗吸血源，但是卻有以下的缺點：(1)需要高品質的抗毒血清，(2)去除近親種類的血清蛋白的干擾，(3)因需長時間作用可能導致血液品質降低，(4)可檢驗出結果的最佳檢體時間為吸血 48 小時內。PCR 方法比較敏感，且可偵測吸血 3 天內的蚊蟲 (Mwangangi et al. 2003)。較適合台灣矮小瘧蚊的研究，因為台灣矮小瘧蚊的密度很低且個體很小。需要一個敏感度較高的檢驗方法。另外有三種指數(forage ratio technique, feeding-index concept 及人血指數 Human Blood Index)常用來矯正吸血源研究的取樣誤差(寄主的存在及吸血雌蚊的取樣偏頗)，其中人血指數是設計用來研究瘧蚊所使用的指數(Garrett-Jones 1964, Tempelis 1975, Washino & Tempelis 1983, Sousa et al. 2001)。

在台灣瘧蚊的種類有記載的共有 17 種，其中寇氏瘧蚊及溪溝瘧蚊可能已絕跡或鑑定錯誤，其中列為傳播瘧疾的病媒蚊種類包括矮小瘧蚊、斑腳瘧蚊、河床瘧蚊、多斑瘧蚊、中華瘧蚊及黑點瘧蚊(Gwadz & Collins 1996)，而台灣依據過去的經驗顯示傳播瘧疾的病媒蚊僅有矮小瘧蚊。其他瘧疾病媒蚊種類在台灣之所以不列入的原因有可能與他們棲息的場所及吸血的習性有關，例如泰國南部的研究顯示斑腳瘧蚊及多斑瘧蚊吸血的喜好為牛隻 (Rattanarithikul et al. 1996)，而減少了傳播瘧疾的機會。早期矮小瘧蚊在台灣為家棲型病媒，依據早期資料顯示白天較喜歡棲息於室內。但最近的調查顯示，其棲息場所可能有改變，從屋內移往屋外。這些瘧疾病媒蚊的種類吸血的喜好是否有改變，值得進一步探討。以釐清各種瘧疾病媒蚊在台灣傳播瘧疾可能扮演的角色。

材料與方法

野外調查

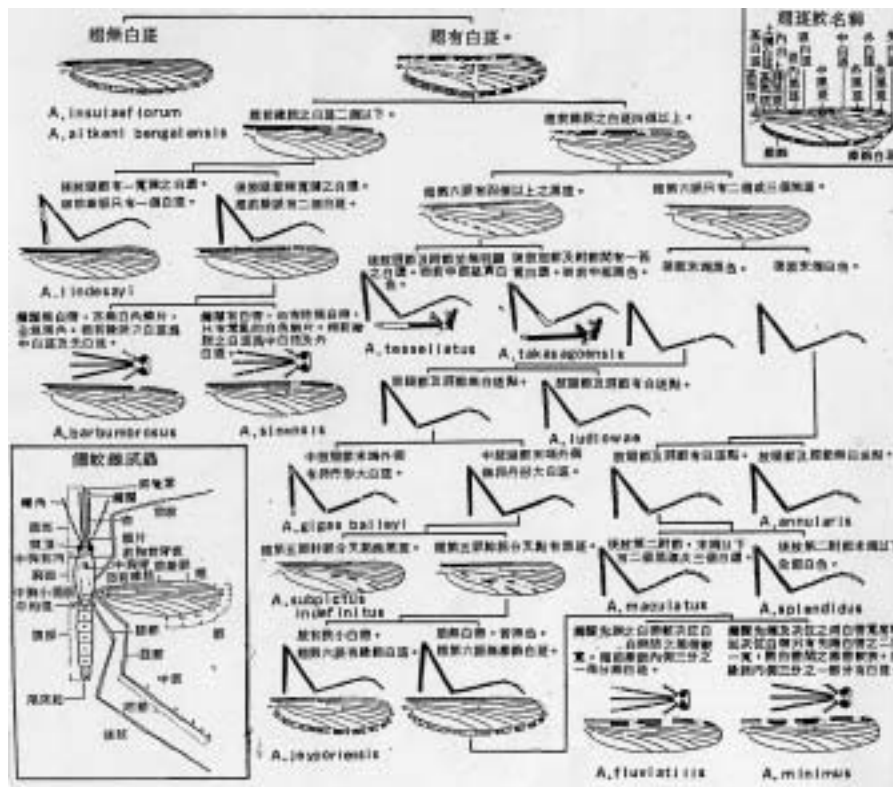
在密度較高的縣市(台南縣、屏東縣、花蓮縣及台東縣)，於四月至八月，每月選擇 2-3 個村莊白天利用吸蟲機(圖一 A)及補蟲網進行矮小瘧蚊棲息場所的調查，棲息場所包括住家、室外牆壁之下角隙縫內，以及草叢間。另外使用針對瘧蚊所設計的 updraft 誘蚊燈(圖一 B)加上乾冰/CO₂ 在晚上於住家外及溪流孳生源處懸掛誘蚊燈，捕捉 1 個晚上，每天晚上 18:00 左右掛燈，第二天早上 8:00 左右收集蚊蟲，放在乾冰或冰塊內，帶回實驗室進行種類鑑定及吸血源的鑑定。另外村莊有動物飼養場所，則於 7:00-7:30 分進行夜間採集半小時(圖一 C)。



圖一、瘧蚊調查工具(A)CDC 背負式吸蟲機(B)updraft 黑光誘蚊燈 (C)夜採

瘧蚊種類及型別鑑定

將採獲之瘧蚊放在冰塊上依周欽賢等(1984)台灣產瘧蚊成蟲檢索圖(圖二)來進行種類鑑定，而矮小瘧蚊以下列形態特徵來進行型別鑑定，A 型：翅脈 M_{1+2} 除基部及末端外，並非全黑，B 型：翅脈 M_{1+2} 除基部及末端外，全黑，C 型：①翅脈 M_{1+2} 除基部及末端外，並非全黑②前緣脈具有一個肩部淡色斑點(Yuan 1987, Green et al. 1990)。



圖二、台灣產瘧蚊成蟲檢索圖(摘自周欽賢等 1984)

吸血源鑑定

1. 吸血源分析鑑定方法

目前較被人利用的吸血源分析鑑定方法為酵素吸附法 enzyme-linked immunosorbent assay 及 PCR 方法，故將於實驗室建立此兩種測試方法，並進行 PCR 敏感性、PCR 專一性及野外族群測試。

酵素吸附法 ELISA

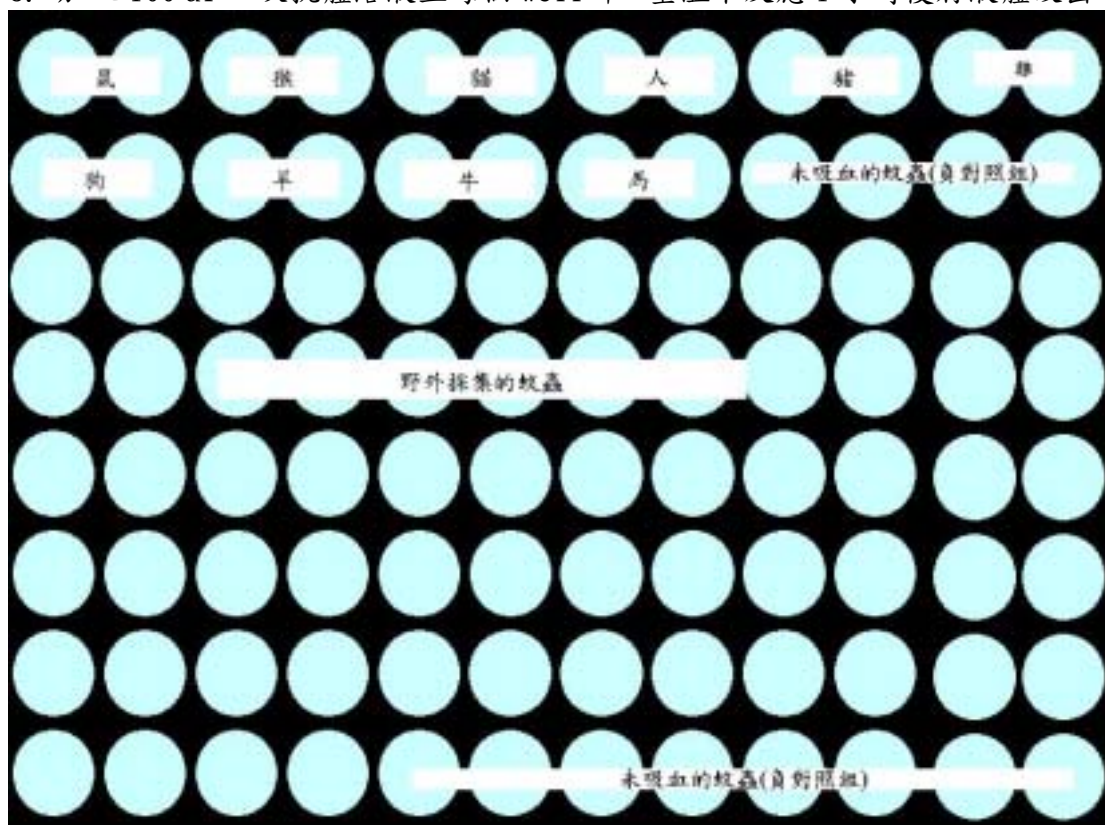
使用 Protein Detector ELISA kit (HRP 系統; Kirkegaard & Perry Laboratories)、一次抗體及二次抗體(如表一)依照下列步驟進行吸血源檢測，每次使用人、猴、貓、豬、雞、羊、馬、牛、狗、鼠等動物血清及單隻未吸血的蚊蟲為對照組(圖三)，每個樣本做兩次。其中未吸血的蚊蟲因為需要計算基礎值(平均值+3SD)，總共做 12 或 14 個 wells。

表一、酵素吸附法所使用的一次抗體及二次抗體。

動物種類	一次抗體	二次抗體	抗體來源
人	Affinity-purified goat anti-human IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-human IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
貓	Affinity-purified goat anti-cat IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-cat IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
狗	Affinity-purified goat anti-dog IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-dog IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
雞	Affinity-purified goat anti-chicken IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-chicken IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
牛	Affinity-purified goat anti-bovine IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-bovine IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
豬	Goat Anti-Swine IgG (H+L)	HRP-labeled Goat Anti-Swine IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch
山羊	Affinity-purified rabbit anti-bovine IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-bovine IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
鼠	Rabbit Anti-Rat IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-rat IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch
猴	Unlabeled Goat Anti-Monkey IgG	HRP-labeled Goat Anti-Monkey IgG	Biosystems
馬	Affinity-purified goat anti-horse IgG, Fc fragment specific	HRP-labeled Affinity-purified goat anti-horse IgG, Fc fragment specific	Jackson ImmunoResearch

1. 將蚊子秤重後，至於 1.5ml tube 中，加入 100 μ l 無菌水研磨，取 50 μ l 研磨液，用 1X Coating Solution 稀釋至 10 μ g/ μ l。
2. 加入 100 μ l Coating Solution (一次抗體以 1X Coating Buffer 稀釋) 至每個 well 中，在室溫下反應 1 小時
3. 全部吸出，輕輕將殘留的液體吸出
4. 加入 300 μ l BSA Diluent/Blocking Solution 至每個 well 中，Incubate 5-15 min 後再將液體吸出
5. 加入 100 μ l 蚊蟲檢體至每個 well 中(事先用 1X Coating Solution 稀釋)，在室溫下反應 1 小時或過夜。
6. 全部吸出(輕輕將殘留的液體吸出)。再以 1X Wash Solution 加滿每個 well，
7. 將 plate 稍微搖晃後吸出(此動作重複 3-5 次)

8. 加入 100 ul 二次抗體溶液至每個 well 中，室溫下反應 1 小時後將液體吸出。



圖三、酵素吸附法中 96-well 的配置圖。

9. 1X Wash Solution 加滿每個 well，將 plate 稍微搖晃後吸出(此動作重複 3-5 次)。

10. 最後一次 wash 停留 5 分鐘後再吸出。

11. 加入 100 ul Enzyme substrate Solution 至每個 well 中，待顏色改變後加入 100 ul Stop Solution。

12. 在 405 nm 下讀取吸附值，若吸附值比負對照阻 ≥ 3 SD，則視為正反應，反之則視為無反應。

PCR 檢測法：

一、粹取 DNA：使用 QIAamp DNA Mini Kit

1. 將蚊子至於 1.5ml tube 中，加入 100 μ l 無菌水研磨，取 50 μ l 研磨液加入 ATL buffer。

2. 加入 Proteinase K 20 μ l，利用震盪器充分混合之後，乾浴至 56°C 1 小時使研磨液完全溶解(完全溶解時間大約 1-3 小時，視組織不同而定)，期間不定時震盪。

3. 稍微離心後加入 AL buffer 200 μ l，震盪 15 秒之後放置 70°C (dry bath) 10 分鐘。

4. 稍微離心後加入 96-100% ethanol 200 μ l，震盪 15 秒。

5. 將步驟 4 之 product 注入 QIAamp spin column，離心 8000 rpm，1 分鐘。

6. 加入 500 μ l 之 WA1 buffer 至步驟 5 之 column，離心 8000 rpm，1 分鐘。
7. 加入 500 μ l 之 WA2 buffer 至步驟 6 之 column，離心 14000 rpm，3 分鐘。
8. 將步驟 7 之 column 再離心 14000 rpm，1 分鐘。
9. 加入 100 μ l AE buffer 並置於室溫 1 分鐘。
10. 離心 8000 rpm 1 分鐘 收取液體保存後續 PCR 使用。

二、PCR

PCR 使用的試劑及劑量如表二。PCR 所選用的 primers 參考 Parodit *et al.* (2002), Rebekah *et al.* (2003) 及 Lahiff *et al.* (2001) 等發表的文章。而控溫程式為 94 2 min; (94 30 sec; A 30 sec; 72 30 sec) 35 循環; 72 20 min; 4 (表三)。

表二、蚊蟲吸血源 PCR 鑑定所使用的試劑及劑量。

試劑項目	體積
10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl PH 8.4, 500mM KCl)	2.5 μ l
<i>Taq</i> polymerase	0.2 μ l
10 mM dNTP Mix (含 50mM MgCl ₂)	1.0 μ l
Primer-R(10 μ M)	0.5 μ l
Primer-F (10 μ M)	0.5 μ l
DNA product	1.0 μ l
Distilled water	19.3 μ l
合計	25.0 μ l

表三、蚊蟲血源鑑定 PCR 所使用的試劑及部分控溫條件。

動物 種類	PCR 使用的 Primers		PCR 的程式中 Annealing 溫度 A	Expected amplicon size
	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'		
鳥	GACTGTGACAAAAT CCCNTTCCA	GGTCTTCATCTYIIGGYT TACAAGAC	64	508bp
雞	GGGACACCCTCCCC CTTAATGACA	GGAGGGCTGGAAGAAG GAGTG	69	266bp
哺乳 動物	CGAAGCTTGATATG AAAAACCATCGTTG	TGTAGTTRTCWGGGTCT CCTA	59	772bp
牛	GCCATATACTCTCC TTGGTGACA	GTAGGCTTGGGAATAGT ACGA	61	271bp
豬	GCCTAAATCTCCCC TCAATGGTA	ATGAAAGAGGCAAATA GATTTTCG	64	212bp
羊	TTAAAGACTGAGAG CATGATA	ATGAAAGAGGCAAATA GATTTTCG	54	225bp
狗	GAAGTAGGTCAGCC CGGTACTT	CGGAGCACCAATTATTA ACGGC	67	153bp
貓	TTCTCAGGATATAC CCTTGACA	GAAAGAGCCCATTGAG GAAATC	60	180bp
鼠	CGGCCACCCAGAAG TGTACATC	GGCTCGGGTGTCTACAT CTAGG	67	196bp
猴	CCTCTTTCCTGCTGC TAATG	TTTGATACTGGGATATG GCG	62	222bp
人	TTCGGCGCATGAGC TGGAGTCC	TATGCGGGGAAACGCC ATATCG	72	228bp
馬	CCCTAAGCCTCCTA ATCCGT	AGGAATGATGGGGGAA GTAA	56	235bp

結果

一、棲息場所調查

經過調查 12 個村里 100 戶在住家內沒有發現瘧蚊棲息，於戶外僅於靠近山豬舍邊的外牆採集到一隻斑腳瘧蚊，但卻於孳生源處邊採集到矮小瘧蚊 6 隻，其中 4 隻吸血，2 隻為有孕待產的雌蟲。1 隻吸血的多斑瘧蚊及 2 隻中華瘧蚊雄蚊 (表四)。所調查的家戶大多都有裝設紗門紗窗，僅少部分沒有，許多大門在白天調查時均敞開，所以於戶內仍可以採集到其他蚊種 146 隻，主要為熱帶家蚊及白腹叢蚊。誘蚊燈懸掛於住家捕捉到的矮小瘧蚊(平均每晚每個誘蚊燈 3.17 隻)及斑腳瘧蚊(平均 1.33 隻)較孳生水域懸掛的多(矮小瘧蚊 0.27,河床瘧蚊 0.64)，而河床瘧蚊及中華瘧蚊則相反。

表四、矮小瘧蚊棲息場所調查結果。

採集地點	採集*方法	n	矮小瘧蚊 隻數	斑腳瘧蚊 平均	河床瘧蚊 隻數	中華瘧蚊 平均	多斑瘧蚊 隻數	其他蚊種 平均
住家	誘蚊燈	12	38	3.17	16	1.33	52	4.58
住家	吸蟲機	12	0	0.00	0	0.00	0	0.00
住家	吸蟲機	12	0	0.00	1	0.08	0	0.00
孳生	誘蚊燈	11	3	0.27	7	0.64	92	8.45
孳生	吸蟲機	11	6	0.55	0	0.00	0	0.00
總計			47		24		144	

*每個村莊調查一次，一個誘蚊燈懸掛 1 個晚上，而且四人分兩組，每組 1 台吸蟲機，1 個補蟲網，調查 1 小時，100 戶住家左右。

*其他蚊種包括熱帶家蚊、白腹叢蚊、白線斑蚊、白肋斑蚊、三斑家蚊等。

二、吸血源檢測

(一) PCR 敏感度測試

利用熱帶家蚊檢測後發現吸食老鼠血 1 小時至後 5 日仍可以檢測 (圖四)。

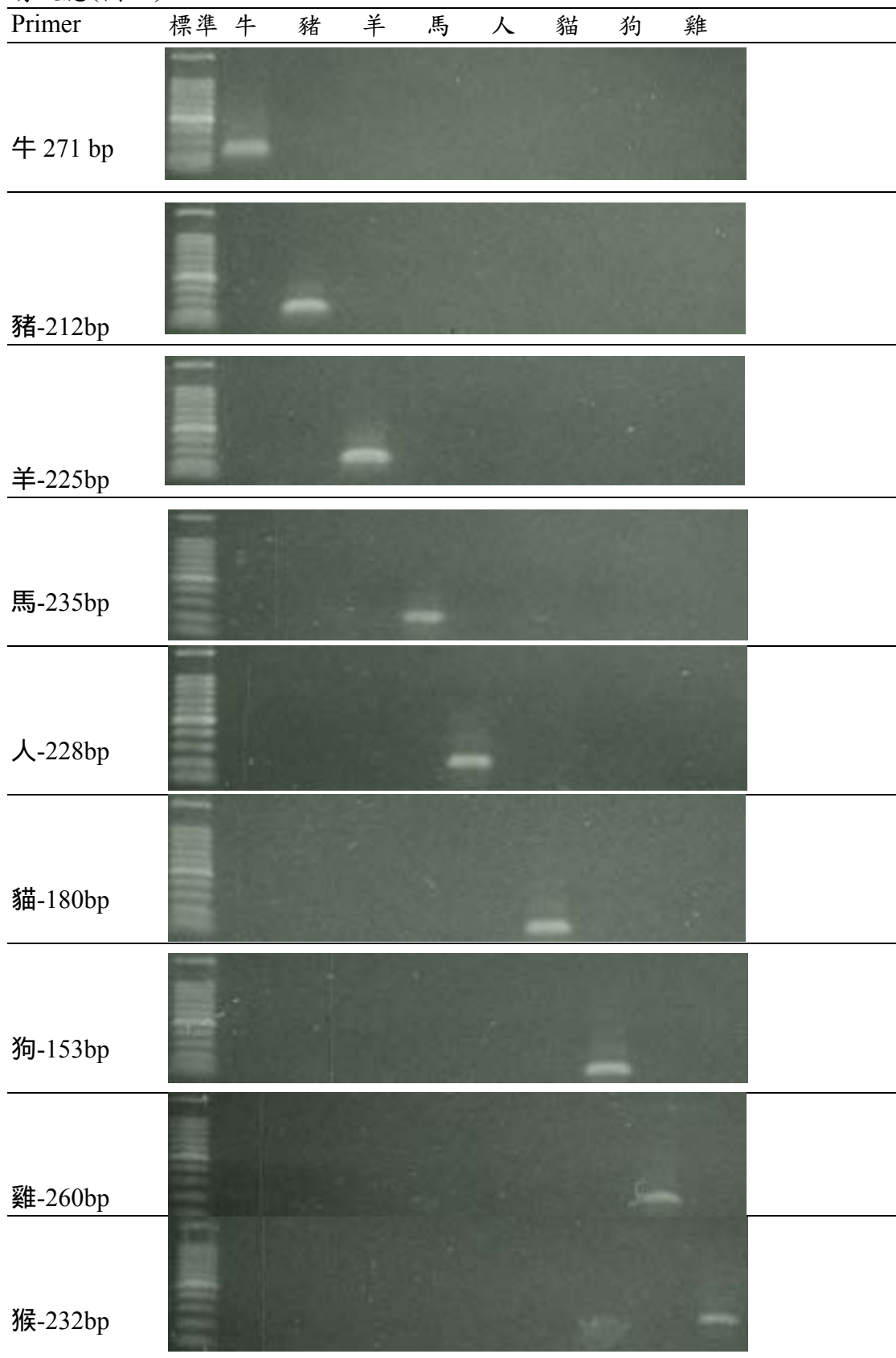


圖四、利用熱帶家蚊吸食老鼠血後 1 小時、檢測 PCR 的敏感度。

(二) PCR 專一性結果

各種動物所使用的 Primers 對所測動物血液均有專一性，而對其他動物均沒

有反應(圖五)。



圖五、鑑定蚊蟲吸血源所使用 primers 的專一性測試。

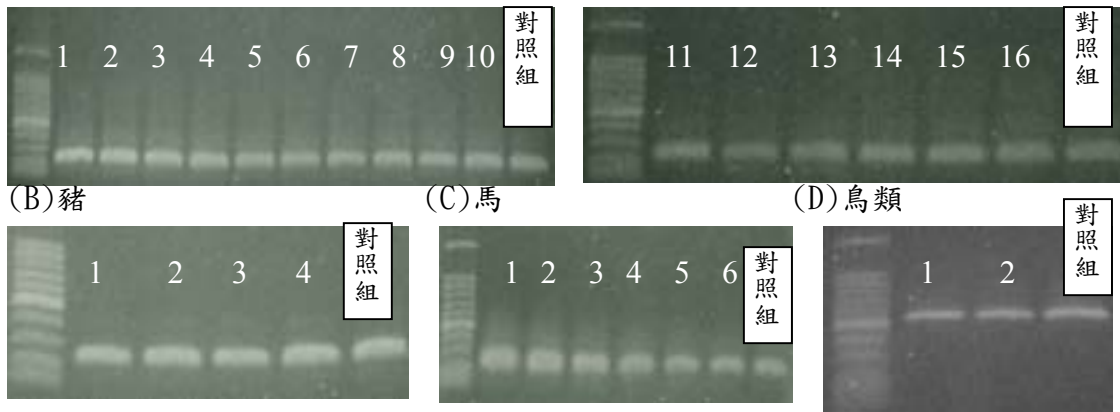
(二)野外族群檢測

在調查的 12 個村莊當中，均有飼養動物的習慣，動物種類包括水牛、山豬、豬、狗、貓、雞、鴨、鵝、山羊等。在住家及孳生水域所採集到的瘧蚊均吸食牛血，而於豬舍、馬棚、牛棚所採集到的蚊蟲均吸食該種動物（表五）。矮小瘧蚊共檢測 6 隻，其中非吸血源處所採集的 5 隻均吸食牛血，而豬舍採集的 1 隻吸食豬血。所以截至目前為止，各種瘧蚊(含矮小瘧蚊)的人血指數均為 0。蚊蟲檢體利用各種動物 PCR 探針所跑出的 PCR 產物詳如圖六。

表五、野外蚊蟲吸血源鑑定結果。

蚊蟲種類	採集地點	採集方法	n	吸血源	吸血源鑑定方法
矮小瘧蚊	住家	誘蚊燈	1	牛	PCR、ELISA
	孳生源	吸蟲機	2	牛	PCR、ELISA
			2	牛	PCR
	豬舍	夜採	1	豬	PCR、ELISA
斑腳瘧蚊	住家	誘蚊燈	3	牛	PCR、ELISA
河床瘧蚊	馬場	夜採	1	馬	PCR
	住家	誘蚊燈	1	牛	PCR、ELISA
中華瘧蚊	牛棚	夜採	2	牛	PCR
	住家	誘蚊燈	1	牛	PCR
	馬場	夜採	2	馬	PCR
多斑瘧蚊	孳生源	吸蟲機	1	牛	PCR、ELISA
三斑家蚊	孳生源	吸蟲機	1	牛	PCR、ELISA
			2	非雞的 鳥類	PCR
	馬場	夜採	1	馬	PCR
環紋家蚊	孳生源	吸蟲機	1	牛	PCR、ELISA
白頭家蚊	孳生源	吸蟲機	1	牛	PCR、ELISA
白線斑蚊	住家	吸蟲機	3	豬	PCR、ELISA
熱帶家蚊	馬場	夜採	2	馬	PCR

(A) 吸血源為牛



圖六、野外蚊蟲吸血源 PCR 的鑑定:最前面為 Marker, 最後面為陽性對照組(A)矮小瘧蚊 Lane 1, 7, 8, 11, 13; 河床瘧蚊 Lane 2; 斑腳瘧蚊 Lane 3, 9, 10; 中華瘧蚊 Lane 14-16; 多斑瘧蚊 Lane 12; 三斑家蚊 Lane 4; 環紋家蚊 Lane 5; 白頭家蚊 Lane 6(B)白線斑蚊 Lane 1-3; 矮小瘧蚊 Lane 4(C)中華瘧蚊 Lane 1, 5; 河床瘧蚊 Lane 2; 熱帶家蚊 Lane 3, 6; 三斑家蚊 Lane 4(D)三斑家蚊 Lane 1-2。

討論

目前以吸蟲機調查矮小瘧蚊棲息場所發現瘧蚊並不棲息於家戶內, 且有吸食牛血的傾向。此於早期調查有異, 早期主要棲息於家戶內, 且喜食人血 (Anonymou 1991), 可能因為村莊大部分家戶均有裝設紗窗, 而家戶內也常發現黃昏出現大量的白腹叢蚊及熱帶家蚊, 所以住戶為避免蚊蟲叮咬於夜晚關窗關門睡覺, 導致矮小瘧蚊夜晚無法進入家戶。

因為今年颱風特多, 破壞矮小瘧蚊孳生場所, 所以密度低, 而無法採集許多樣本, 以進行吸血源鑑定 (仍應進行更多的樣本分析)。由目前分析結果顯示牛隻為瘧蚊的主要吸血源, 而其他動物, 如豬及馬亦可充當吸血源。目前並沒有發現吸食人血, 所以降低瘧疾傳播的危險。

早期台灣瘧疾得以根除, 利用矮小瘧蚊喜歡棲息於戶內, 而進行大面積家戶內 DDT 殘效性噴灑。但由棲息場所調查結果發現台灣矮小瘧蚊無法進入家戶內棲息, 所以戶內殘效性噴灑以無法防治矮小瘧蚊, 但因為掛燈仍可以採集到矮小瘧蚊, 所以夜間進行空間噴灑仍有效果。另外, 於動物飼養場所牆壁或附近牆壁, 仍可採獲瘧蚊, 所以可於這些牆壁進行殘效性噴灑。

結論與建議

因為此為第一年初步調查結果，所作建議：

- 一、經初步結果發現瘧蚊並不棲息於住家戶內，所以家戶殘效性噴灑並不適用，但因為掛燈仍可以採集到瘧蚊，所以夜晚空間噴灑仍有效果。
- 二、戶外於靠近山豬舍的牆壁以吸蟲機採集到一隻斑腳瘧蚊雌蚊，而且於豬舍、馬舍及牛舍夜採均常常採集到瘧蚊雌蚊，所以可於動物養殖處所進行殘效性噴灑。
- 三、目前吸血源檢測結果發現矮小瘧蚊吸食牛血及豬血，尚未發現吸食人血。

參考文獻

- 病媒及昆蟲病組。1998。台灣地區矮小瘧蚊 *Anopheles minimus* 密度監視與分布範圍之研究。衛生署八十六年計畫。
- 周欽賢、連日清及王正雄。1984。醫學昆蟲學。南山堂出版社，536 頁。
- Anonymous. 1991. Malaria eradication in Taiwan. Department of Health, The Executive Yuan, R. O. C. 300 pp.
- Garrett-Jones, C. 1964. The human blood index of malaria vectors in relation to epidemiological assessment. Bull. WHO 30:241-261.
- Gwadz, R., and F. H. Collins. 1996. Eds: Beaty, B. J., and W. C. Marquardt. The biology of disease vectors. University Press of Colorado. 632pp.
- Lahiff, S., M. Glennon, L. O'Brien, J. Lyng, T. Smith, M. Maher and N. Shilton. 2001. Species-specific PCR for the identification of ovine, porcine and chicken species in meat and bone meal (MBM). Molecular and Cellular Probes 15:27-35.
- Mukabana, W. R., W. Takken and B. G. J. Knols. 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. Trends in Parasitology 18:505-509.
- Mwangangi, J. M., C. M. Mbogo, J. G. Nzovu, J. I. Githure, G. Yan and J. C. Beier. 2003. Blood-meal analysis for Anopheline mosquitoes sampled along the Kenyan coast. J. Amer. Mosq. Control Assoc. 19:371-375.
- Ngo, K. A., and L. D. Kramer. 2003. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. J. Med. Entomol. 40: 215-222.
- Parodi, B., O. Aresu, d. Bini, R. Lorenzini, f. Schena, P. Visconti, M. Cesaro, D. Ferrere, V. Andreotti, and T. Ruzzon. 2002. species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method. BioTechniques 32:432-440.

- Rattanarithikul R. Konishi E. Linthicum KJ. Observations on nocturnal biting activity and host preference of anophelines collected in southern Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 12(1):52-7, 1996.
- Sousa, C. A., J. Pinto, A. P. G. Almeida, C. Ferreira, V. E. D. Rosario, and J. D. Charlwood. 2001. Dogs as a favored host choice of *Anopheles gambiae sensu stricto* (Diptera: Culicidae) of Sao Tome, West Africa. *J. med. Entomol.* 38:122-125.
- Tempelis, G. H. 1975. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. *J. Med. Entomol.* 11:635-653.
- Teng, H. J., Y. L. Wu, S. J. Wang and C. Lin. 1998, Effects of environmental factors on abundance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) larvae and their seasonal fluctuation. *Environ. Entomol.* 27:324-328.
- Washino, R. K, and C. H. Tempelis. 1983. Mosquito host bloodmeal identification: Methodology and data analysis. *Ann. Rev. Entomol.* 28:179-201.