สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้าน Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) ในห้องปฏิบัติการ

Anticoagulants in in Blood Meal Feeding for Laboratory Rearing of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

นูรไอนี ยายา
กราญ์จนา ถาอินชุม

Nur-ainee Yaya
Krajana Tainchum

สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงยุงพาหะนำโรคในห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนสำคัญในการวิจัยทางกีฏวิทยาที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของยุง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในการเลี้ยงยุงลายบ้าน *(Aedes aegypti)* ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 7 ชนิด ได้แก่ EDTA K3, Li-Heparin, Sodium fluoride, Sodium citrate, CPD, CPDA-1 และกลุ่มควบคุม (พลาสมา) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ณ ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2559 ถึงมีนาคม 2560 โดยใช้ยุงลายบ้านเพศเมียอายุ 5-7 วัน และให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม ผลการศึกษาพบว่าอัตราการสืบพันธุ์ ได้แก่ จำนวนไข่ ดักแด้ และตัวเต็มวัย ที่ได้จากยุงลายบ้านเพศเมียที่กินเลือดผสมสารป้องกันการแข็งตัวทั้ง 7 ชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (พลาสมา) ให้จำนวนไข่เฉลี่ยสูงสุด (593.33 ± 105.88 ฟอง) จำนวนดักแด้ (430.00 ± 112.73 ตัว) ตัวเต็มวัยเพศผู้ (178.33 ± 38.76 ตัว) และตัวเต็มวัยเพศเมีย (251.67 ± 74.18 ตัว) โดยมีอัตราการรอดชีวิตจากระยะไข่จนถึงตัวเต็มวัย 33% รองลงมาคือ CPD (380.67 ± 124.54 ฟอง) และ CPDA-1 (362.00 ± 239.83 ฟอง) ในขณะที่ยุงที่ได้รับเลือดผสม Sodium fluoride ไม่พบการพัฒนาของไข่ (0.00 ± 0.00 ฟอง) Li-Heparin ให้ผลต่ำในทุกระยะการพัฒนา (30.00 ± 30.00 ฟอง) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้พลาสมาเป็นทางเลือกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการผ่านการให้เลือดทางเมมเบรนเทียม ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลือกสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่เหมาะสม เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงยุง และเป็นทางเลือกในการทดแทนการใช้สัตว์ทดลองตามหลักจริยธรรม 3Rs ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคติดต่อนำโดยยุง

คำสำคัญ: สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด, ยุงลายบ้าน, การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม, พลาสมา, การเพาะเลี้ยงยุงพาหะ

Abstract

Laboratory rearing of mosquito vectors is essential for entomological research, influencing both mosquito quantity and quality. This study aimed to evaluate the efficacy of anticoagulants in blood meal feeding for rearing Aedes aegypti in the laboratory. Seven anticoagulants were tested: EDTA K3, Li-Heparin, Sodium fluoride, Sodium citrate, CPD, CPDA-1, and a control group (plasma). The experiments were conducted in triplicate at the Entomology Laboratory, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Thailand, from November 2016 to March 2017, using 5-7-day old female *Ae. aegypti* fed through an artificial membrane feeding system. The results showed significant differences ($p<0.05$) in reproductive rates, including the number of eggs, pupae, and adults, among mosquitoes fed with the seven anticoagulant treatments. The control group (plasma) produced the highest mean number of eggs (593.33 ± 105.88), pupae (430.00 ± 112.73), adult males (178.33 ± 38.76), and adult females (251.67 ± 74.18), with a 33% survival rate from egg to adult stages. CPD (380.67 ± 124.54 eggs) and CPDA-1 (362.00 ± 239.83 eggs) ranked second and third, respectively. In contrast, mosquitoes fed with Sodium fluoride-treated blood showed no egg development (0.00 ± 0.00), while Li-Heparin yielded poor results across all developmental stages (30.00 ± 30.00 eggs). This study demonstrates that plasma is the most effective option for laboratory rearing of *Ae. aegypti* through artificial membrane feeding, providing valuable information for selecting appropriate anticoagulants, enhancing rearing efficiency, and offering an alternative that complies with the 3Rs ethical principles by replacing animal models in vector-borne disease research.

คำสำคัญ: สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด, ยุงลายบ้าน, การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม, พลาสมา, การเพาะเลี้ยงยุงพาหะ

บทนำ

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* (L.)) เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุข เนื่องจากเป็นพาหะนำโรคไข้เลือดออกที่สำคัญ พบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตอบอุ่น โดยเฉพาะในบริเวณบ้านเรือนที่อยู่ใกล้ชิดกับมนุษย์ [1] ลักษณะเด่นของยุงชนิดนี้คือมีพฤติกรรมชอบอาศัยและเกาะพักในบริเวณที่มนุษย์อยู่อาศัย และชอบกินเลือดมนุษย์ ทำให้มีโอกาสในการแพร่เชื้อไวรัสเด็งกี่สูง[2] ปัจจุบันโรคไข้เลือดออกยังคงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยและหลายประเทศในเขตร้อน มีการรายงานผู้ป่วยและผู้เสียชีวิตเป็นจำนวนมากในแต่ละปี โรคไข้เลือดออกเป็นสาเหตุของการเจ็บป่วยและเสียชีวิต โดยเฉพาะในเด็กและผู้สูงอายุ ผู้ป่วยอาจมีอาการรุนแรง เช่น ไข้สูง เลือดออก ช็อก และอวัยวะล้มเหลวโรคไข้เลือดออกอาจทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนระยะยาว เช่น กลุ่มอาการหลังไข้เลือดออก (post-dengue syndrome) สถานการณ์โรคไข้เลือดออก ปี 2562 ประเทศไทยพบผู้ป่วยทั้งสิ้น 131,157 ราย [3] กระจายทั่วทุกจังหวัดในประเทศไทย และสร้างภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาลเป็นจำนวนมาก

โรคไข้เลือดออกทำให้เกิดภาระค่าใช้จ่ายในการรักษาพยาบาล ทั้งสำหรับผู้ป่วยและระบบสาธารณสุข การระบาดของโรคทำให้เกิดการขาดงาน ขาดเรียน และสูญเสียผลิตภาพทางเศรษฐกิจ การระบาดของโรคอาจส่งผลกระทบต่อการท่องเที่ยวและการลงทุน การควบคุมประชากรยุงพาหะนำโรคและการพัฒนาวิธีการป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัสเด็งกี่ จึงเป็นยุทธศาสตร์สำคัญในการควบคุมโรค ซึ่งการดำเนินการดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับชีววิทยา พฤติกรรม และนิเวศวิทยาของยุงลายบ้านอย่างถ่องแท้ การศึกษาวิจัยในห้องปฏิบัติการจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงยุงที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ประชากรยุงที่มีคุณภาพ

และปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาวิจัย ยุงลายบ้านมีแนวโน้มที่จะพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลง ทำให้การควบคุมประชากรยุงทำได้ยากขึ้น การใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างไม่เหมาะสมอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศส่งผลกระทบต่อยุงลายบ้านหลายด้าน ทั้งการเปลี่ยนแปลงในวงจรชีวิตและพฤติกรรม การขยายพื้นที่การแพร่กระจาย และการเพิ่มขึ้นของแหล่งเพาะพันธุ์ นอกจากนี้ การขยายตัวของเมืองยังทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแหล่งเพาะพันธุ์ เช่น ภาชนะกักเก็บน้ำและขยะ ส่งผลให้ประชากรยุงลายบ้านในเขตเมืองเพิ่มขึ้น และเกิดความยากลำบากในการเข้าถึงและควบคุมแหล่งเพาะพันธุ์พฤติกรรมของมนุษย์ เช่น การทิ้งขยะไม่เป็นที่ การไม่กำจัดแหล่งน้ำขัง และการไม่ป้องกันตนเองจากยุงกัด มีส่วนสำคัญในการแพร่กระจายของยุงลายบ้านการเปลี่ยนแปลงวิถีชีวิตและพฤติกรรมของมนุษย์ทำให้เกิดความท้าทายในการควบคุมยุงลายบ้าน

การเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการได้รับการพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะวิธีการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม (artificial membrane feeding) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและใช้อย่างแพร่หลาย วิธีการนี้มีข้อดีคือสามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของเลือดได้ และลดการใช้สัตว์ทดลอง แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของประสิทธิภาพในการให้ยุงกินเลือด และการเลือกใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่เหมาะสม [4-7] วิธีการนี้สามารถทดแทนการใช้สัตว์ทดลองเป็นแหล่งเลือดสำหรับยุงเพศเมีย ซึ่งจำเป็นต้องได้รับเลือดเพื่อการพัฒนาไข่ อย่างไรก็ตาม ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านด้วยวิธีนี้คือ การเลือกใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulants) ที่เหมาะสม เนื่องจากสารเหล่านี้อาจส่งผลต่อคุณภาพของเลือดและความสามารถในการสืบพันธุ์ของยุง [8]

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดต่างๆ ต่อการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 7 ชนิด ได้แก่ EDTA K3, Li-Heparin, Sodium fluoride, Sodium citrate, CPD, CPDA-1 และชุดควบคุม (พลาสมา) กับประชากรยุงลายบ้านรุ่น F2 ในระยะเวลา 5 เดือน การศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นและเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการควบคุมยุงพาหะและโรคไข้เลือดออกต่อไป

วิธีการศึกษา

1. ประชากรยุงสำหรับทดสอบ

ทำการเพาะขยายยุงลายบ้าน สายพันธุ์ห้องปฏิบัติการ USDA ที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยได้รับไข่ยุงลายบ้านจากภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งมีการเลี้ยงมานานกว่า 50 รุ่น วางไข่ยุงในน้ำสะอาดและแยกเลี้ยงลูกน้ำยุงวัย 2 ปริมาณ 150 ตัวในถาดพลาสติก ที่มีน้ำกรองสะอาดประมาณ 150 มิลลิลิตรต่อถาด ให้อาหารปลา (ซากุระ®บริษัทรอยัล นอริช จำกัด กรุงเทพมหานคร) เป็นอาหารของลูกน้ำ เมื่อเข้าดักแด้ใช้หลอดดูดเก็บดักแด้ใส่ถ้วยพลาสติกและนำไปใส่ในกรงเลี้ยงยุงขนาด 30×30×30 ซม^3 ให้น้ำหวานเข้มข้น 10% เป็นอาหารตัวเต็มวัย

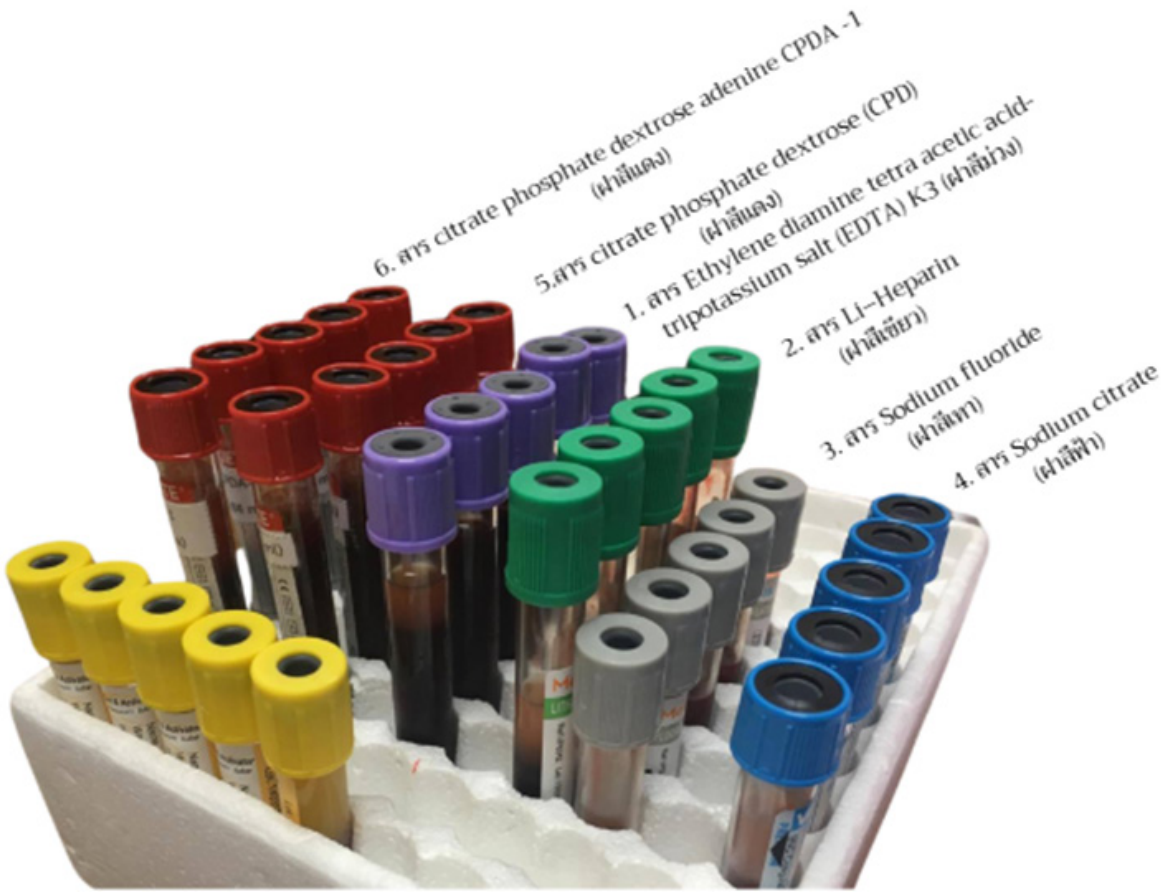
2. การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม (Artificial membrane feeding)

ดำเนินการคัดเลือกยุงลายบ้านตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีอายุระหว่าง 5-7 วัน ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดต่างๆ ต่อการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของยุง โดยใช้เลือดที่เหลือจากการเรียนการสอนของคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งยังไม่หมดอายุและมีอายุไม่เกิน 1 สัปดาห์ ณ วันที่นำมาใช้ในการทดสอบ เลือดที่นำมาทดสอบได้รับการผสมด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด การใช้หลอดเก็บตัวอย่างเลือดมาตรฐานที่เตรียมไว้สำหรับการเก็บเลือดในงานทางคลินิก มีปริมาณสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสม ทั้ง 7 ชนิด ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดแยกประเภทตามสีฝาหลอด ได้แก่ 1. สาร Ethylene diamine tetra acetic acid- tripotassium salt (EDTA) K3 (ฝาสีม่วง) 2. สาร Li–Heparin (ฝาสีเขียว) 3. สาร Sodium fluoride (ฝาสีเทา) 4. สาร Sodium citrate (ฝาสีฟ้า) 5.สาร citrate phosphate dextrose (CPD) (ฝาสีแดง) 6. สาร citrate phosphate dextrose adenine CPDA -1 (ฝาสีแดง) และ 7. พลาสมา คือส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเลือดที่มีการผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดแล้วเป็นชุดควบคุม (ฝาสีเหลือง) ดังภาพที่ 1 เลือดทั้งหมดได้รับการเก็บรักษาในสาร ACD solution (Acid citrate dextrose solution) ที่อุณหภูมิ 4°C ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเลือด เนื่องจากมีส่วนผสมของ dextrose

ที่เป็นแหล่งอาหารและช่วยรักษาสภาพเม็ดเลือดแดงให้มีอายุยาวนานขึ้น บุญศรี มหากิตติคุณ [9] ทำการเตรียมยุงในกล่องพลาสติกใสขนาดปากขวด 12.0 ซม. กว้าง 15.8 ซม. สูง 23.2 ซม ที่หุ้มด้วยผ้ามุ้งสีขาว อดน้ำหวานก่อนให้กินเลือด 24 ชั่วโมง เตรียมยุงเพศเมีย 20 ตัวต่อ 1 กระเปาะแก้ว โดยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 1 สาร ทำ 3 ซ้ำ ติดตั้งกระเปาะแก้วอุปกรณ์การให้เลือด (feeder apparatus) หุ้มกระเปาะแก้วด้วยแผ่นพาราฟิล์มสำหรับให้ยุงดูดเลือด และรักษาอุณหภูมิของเลือดด้วยการผ่านน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-37 ºC ในสายยางซิลิโคน โดยให้ยุงกินเลือดนานต่อเนื่อง 30 นาที หลังจากที่ให้ยุงกินเลือดแล้วนำขวดพร้อมแท่งพันสำลีชุบน้ำหวานเข้มข้น 10% วางไว้ในกรง ดังภาพที่ 2

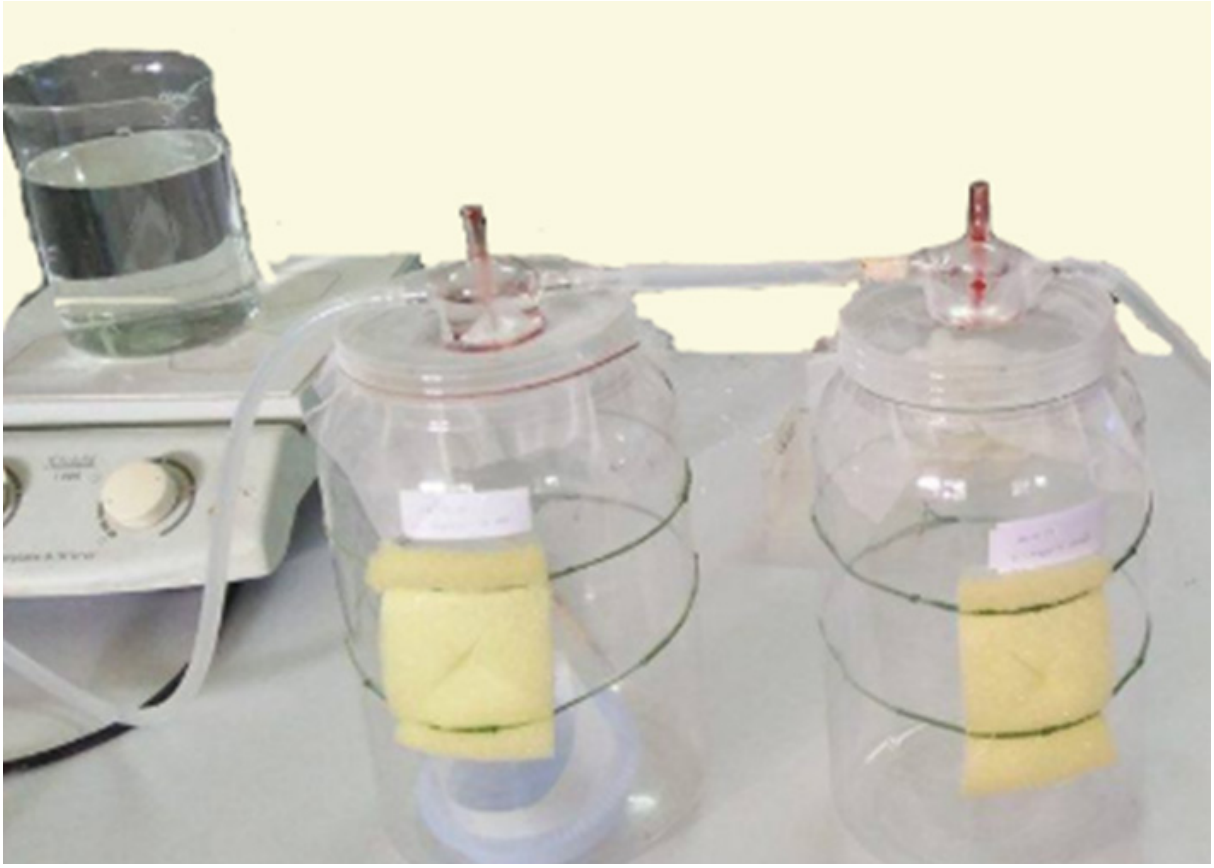
3. บันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง

หลังจากที่ยุงกินเลือดนาน 2 วัน โดยพยายามให้ยุงกินเลือดให้ครบทุกตัว เตรียมถ้วยวางไข่โดยการใส่กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ในถ้วยที่มีน้ำสะอาด 75 มิลลิลิตร นำถ้วยใส่เข้าไปในกรง ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 วัน นำไข่มานับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stereo Microscope) เพื่อประเมินอัตราการวางไข่ หลังจากนั้น 2 วัน นำไข่ที่ได้นำไปฟักในถาดที่ใส่น้ำสะอาด เพื่อประเมินอัตราการฟักเป็นลูกน้ำ เลี้ยงลูกน้ำยุงด้วยอาหารปลาซากุระความถี่ในการให้อาหาร 1 ครั้ง ต่อวันจนเข้าดักแด้ นับจำนวนดักแด้ในแต่ละวันและเลี้ยงต่อจนเป็นตัวเต็มวัย นับจำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนไข่ จำนวนดักแด้ จำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้ และจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่กินเลือดผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดทั้ง 7 ชนิด ด้วย one-way ANOVA และ Duncan's multiple range tests of mean โดยโปรแกรม SPSS for Windows (version 10) (Chicago, USA)



พลาสมาคือส่วนที่ใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเลือดที่มีการผสมผสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดแล้วเป็นชุดควบคุม (ฝาสีเหลือง)

ภาพที่ 1 เลือดที่จะใช้เลี้ยงยุงที่มีการผสมสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดทั้ง 7 ชนิด



ภาพที่ 2 อุปกรณ์ให้ยุงดูดเลือด (Mosquito Feeding Apparatus) สำหรับการศึกษาผลของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดต่อการเจริญเติบโตของยุงลายบ้านเพศเมีย โดยไม่ต้องใช้สัตว์ทดลอง

ผลการทดลอง

การวางไข่: จากการทดลองศึกษาผลของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 7 ชนิดต่อการวางไข่ของยุงลายบ้าน *(Aedes aegypti)* พบว่าสารแต่ละชนิดมีผลต่อจำนวนไข่ที่ยุงวางแตกต่างกัน (p= 0.032) โดยกลุ่มควบคุม (พลาสมา) ให้จำนวนไข่เฉลี่ยสูงสุด (593.33 ± 105.88 ฟอง) รองลงมาได้แก่ สาร CPD (380.67 ± 124.54 ฟอง), CPDA-1 (362.00 ± 239.83 ฟอง), Sodium citrate (238.00 ± 62.06 ฟอง), EDTA K3 (188.67 ± 65.46 ฟอง), และ Li-Heparin (30.00 ± 30.00 ฟอง) ตามลำดับ ขณะที่ยุงที่กินเลือดผสมสาร Sodium fluoride ไม่มีการวางไข่ (0.00 ± 0.00 ฟอง) การวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่ากลุ่มควบคุมให้จำนวนไข่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใช้ EDTA K3, Li-Heparin และ Sodium fluoride แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มที่ใช้ Sodium citrate, CPD และ CPDA-1 (รูปที่ 3A)

การเจริญเติบโตระยะดักแด้: ผลการศึกษาจำนวนดักแด้ที่พัฒนามาจากไข่ของยุงที่กินเลือดผสมสารป้องกันการแข็งตัวชนิดต่างๆ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยกลุ่มควบคุมให้จำนวนดักแด้เฉลี่ยสูงสุด (430.00 ± 112.73 ตัว) รองลงมาได้แก่ EDTA K3 (83.00 ± 23.06 ตัว), CPD (77.67 ± 29.36 ตัว), CPDA-1 (74.00 ± 71.00 ตัว), Sodium citrate (70.67 ± 47.17 ตัว) และ Li-Heparin (11.33 ± 11.33 ตัว) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่ากลุ่มควบคุมให้จำนวนดักแด้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในขณะที่กลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3B)

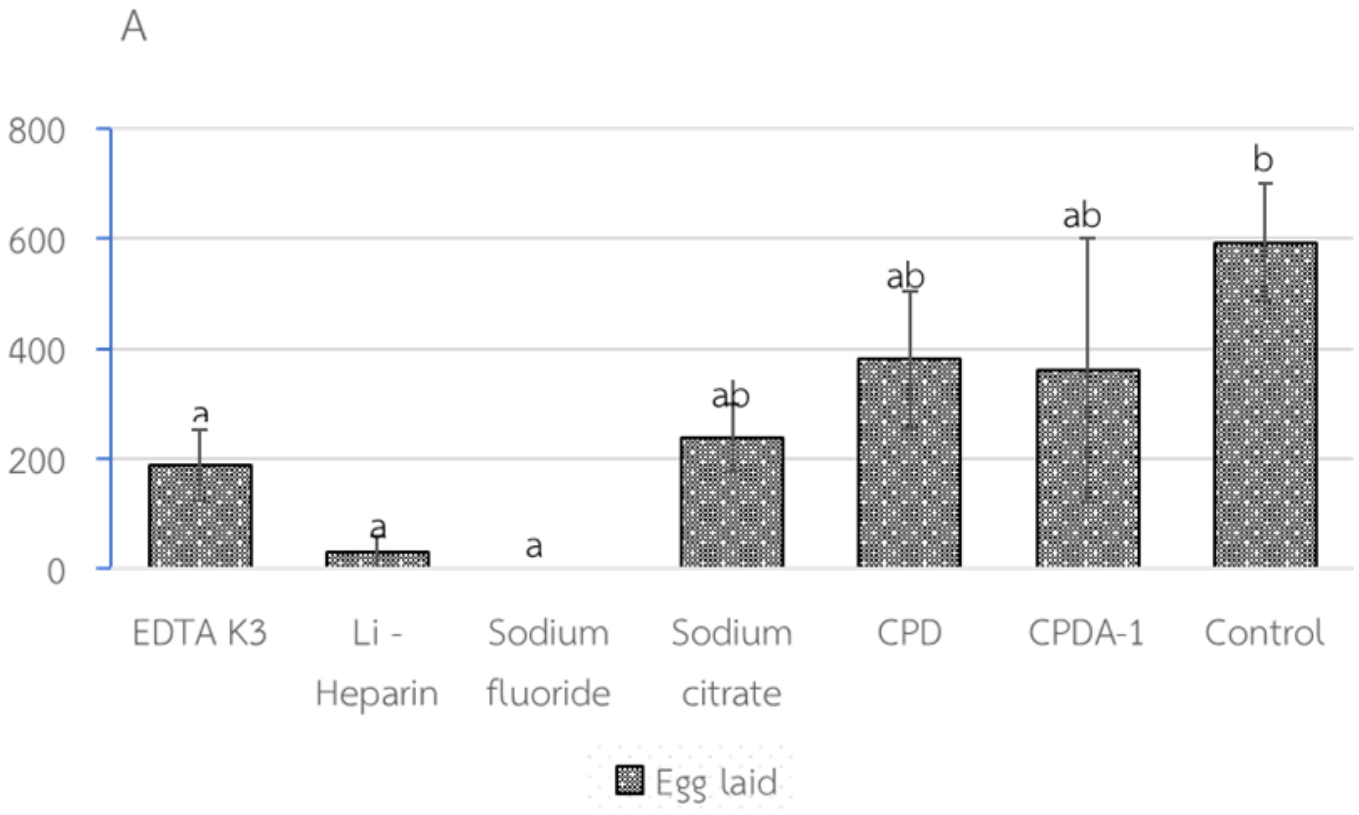
การเจริญเติบโตระยะตัวเต็มวัยเพศผู้: การศึกษาจำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้ที่พัฒนามาจากดักแด้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยกลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้เฉลี่ยสูงสุด (178.33 ± 38.76 ตัว) รองลง

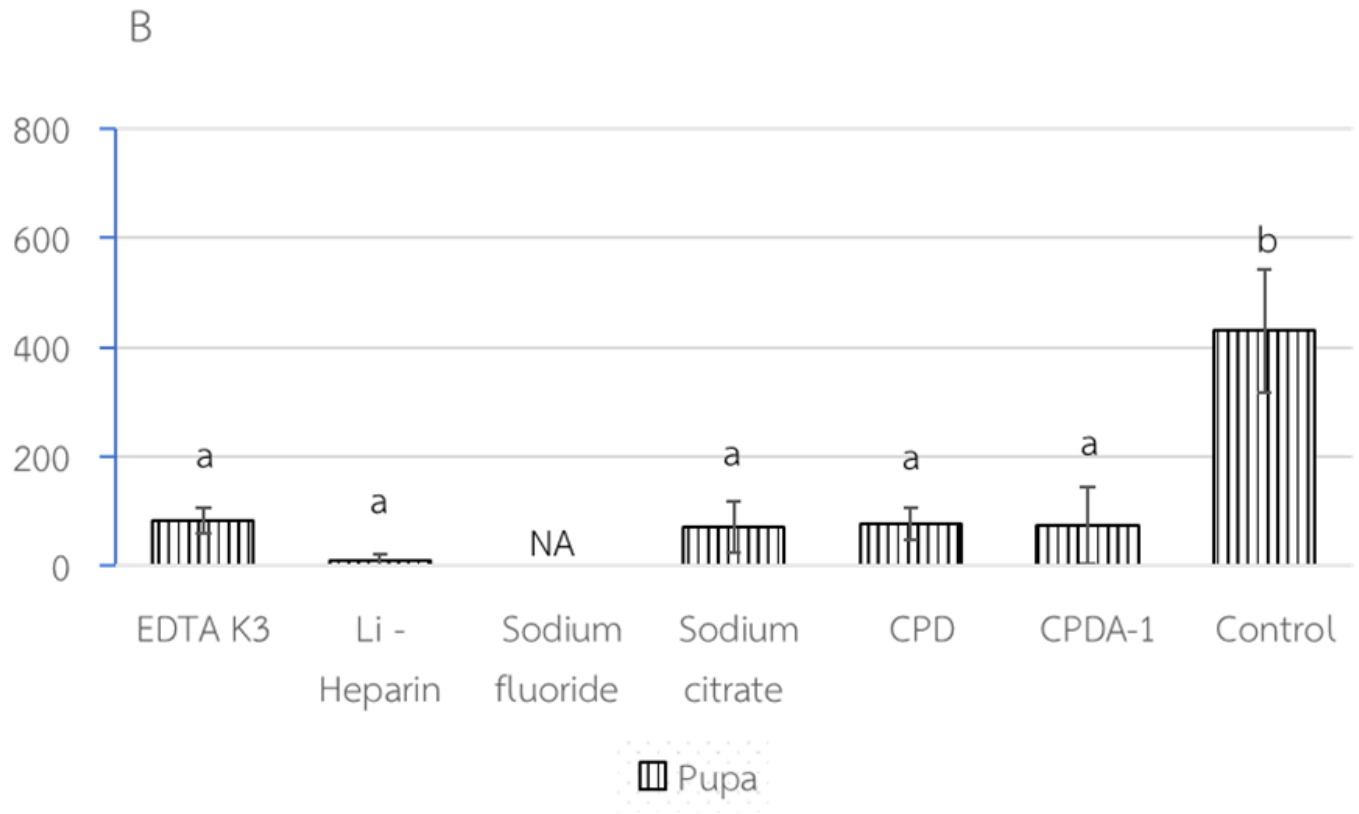
มาได้แก่ CPD (44.33 ± 24.83 ตัว), CPDA-1 (37.33 ± 34.33 ตัว), EDTA K3 (35.67 ± 9.28 ตัว), Sodium citrate (31.33 ± 19.36 ตัว) และ Li-Heparin (6.33 ± 6.33 ตัว) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี Duncan's multiple range test พบว่ากลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ขณะที่กลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวทั้ง 6 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3C)

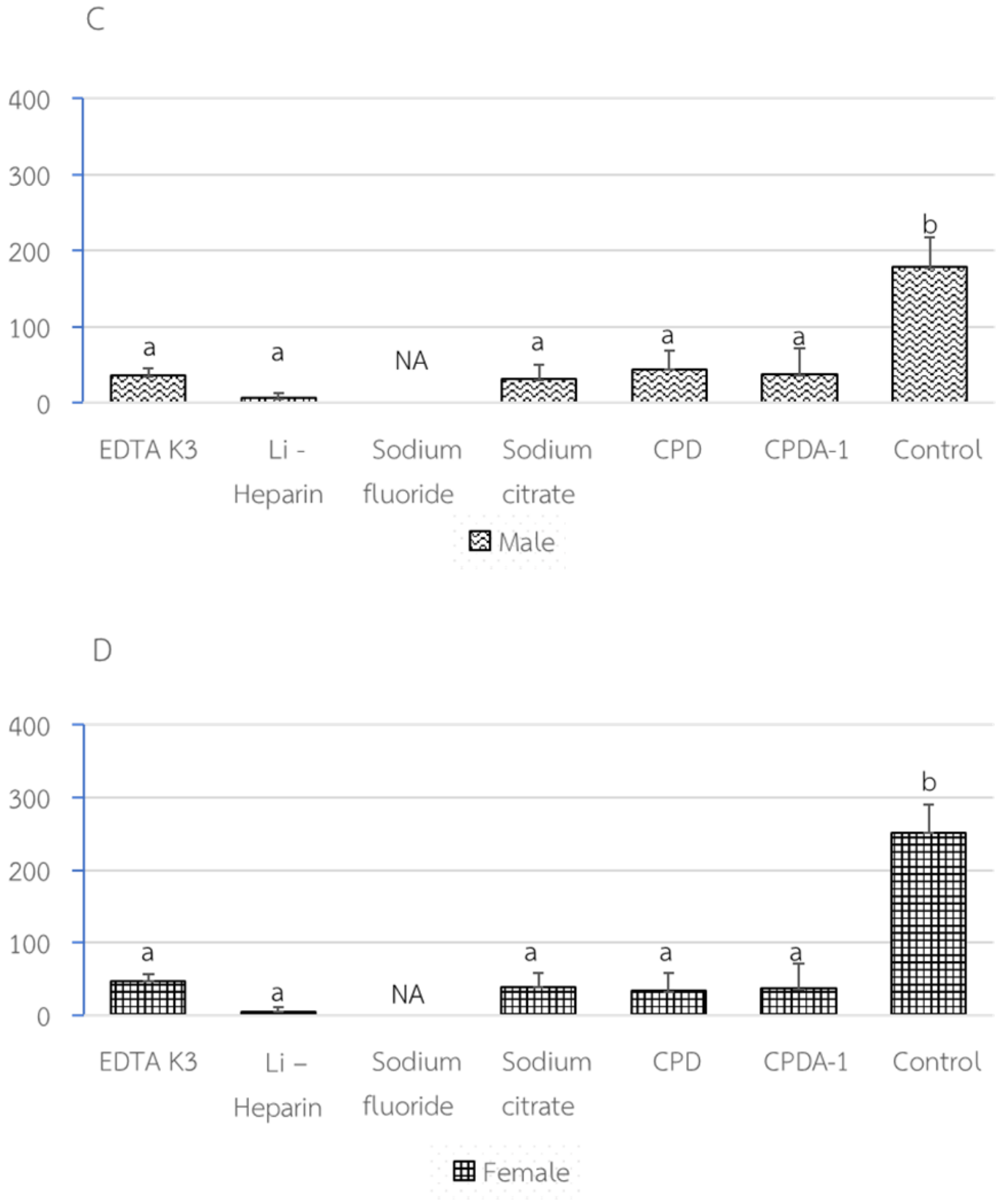
การเจริญเติบโตระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย: จากการศึกษาจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่พัฒนาจากดักแด้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยกลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียเฉลี่ยสูงสุด (251.67 ± 74.18 ตัว) รองลงมาได้แก่ EDTA K3 (47.33 ± 13.95 ตัว), Sodium citrate (39.33 ± 27.93 ตัว), CPDA-1 (36.67 ± 36.66 ตัว), CPD (33.33 ± 7.17 ตัว) และ Li-Heparin (5.00 ± 5.00 ตัว) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่ากลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ขณะที่กลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวทั้ง 6 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3D)

การเจริญเติบโตระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย: จากการศึกษาจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่พัฒนาจากดักแด้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) โดยกลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียเฉลี่ยสูงสุด (251.67 ± 74.18 ตัว) รองลงมาได้แก่ EDTA K3 (47.33 ± 13.95 ตัว), Sodium citrate (39.33 ± 27.93 ตัว), CPDA-1 (36.67 ± 36.66 ตัว), CPD (33.33 ± 7.17 ตัว) และ Li-Heparin (5.00 ± 5.00 ตัว) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's multiple range test พบว่ากลุ่มควบคุมให้จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับทุกกลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ขณะที่กลุ่มที่ใช้สารป้องกันการแข็งตัวทั้ง 6 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 3D)

สัดส่วนการอยู่รอดในแต่ละระยะการพัฒนา: จากการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของยุงในแต่ละระยะการพัฒนาหลังจากตัวเต็มวัยเพศเมียได้รับเลือดที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัวชนิดต่างๆ พบว่าสารแต่ละชนิดมีผลต่อสัดส่วนการอยู่รอดแตกต่างกัน โดยกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด โดยในระยะไข่คิดเป็น 33% ระยะดักแด้ 58% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 54% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 61% ขณะที่สาร CPD ให้สัดส่วนการอยู่รอดในระยะไข่ 21% ระยะดักแด้ 10% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 13% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 10% ส่วนสาร CPDA-1 ให้สัดส่วนการอยู่รอดในระยะไข่ 20% ระยะดักแด้ 10% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 11% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 9% สาร Sodium citrate ให้สัดส่วนการอยู่รอดในระยะไข่ 13% ระยะดักแด้ 9% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 9% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 10% สาร EDTA K3 ให้สัดส่วนการอยู่รอดในระยะไข่ 11% ระยะดักแด้ 11% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 11% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 11% สาร Li-Heparin ให้สัดส่วนการอยู่รอดต่ำมากในทุกระยะการพัฒนา (ระยะไข่ 2% ระยะดักแด้ 2% ระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 2% และระยะตัวเต็มวัยเพศเมีย 1%) ส่วนสาร Sodium fluoride ไม่พบการอยู่รอดในทุกระยะการพัฒนา (0%)


A
800
600
400
200
0
a
a
a
ab
ab
ab
b
EDTA K3
Li - Heparin
Sodium fluoride
Sodium citrate
CPD
CPDA-1
Control
Egg laid


B
800
600
400
200
0
a
a
NA
a
a
a
b
EDTA K3
Li - Heparin
Sodium fluoride
Sodium citrate
CPD
CPDA-1
Control
Pupa



ภาพที่ 3 ผลของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดต่อการเจริญเติบโตในรุ่นลูกยุงลายบ้าน: การเปรียบเทียบจำนวนไข่ที่วางได้ (A) จำนวนดักแด้ (B) จำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้ (C) และจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมีย (D) ที่เกิดจากยุงเพศเมียที่ได้รับเลือดผสมสารป้องกันการแข็งตัวชนิดต่างๆ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p<0.05$ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test, NA=ไม่ปรากฏหลักฐาน

วิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการเป็นขั้นตอนสำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยุงพาหะนำโรค โดยเฉพาะในประเด็นของการควบคุมประชากรยุง การทดสอบสารเคมี และการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อก่อโรค ปัจจุบันได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องในหลายด้าน ทั้งการพัฒนาระบบการเลี้ยง อุปกรณ์ และแหล่งอาหาร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตยุงให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพ[10] Balestrino และคณะ[11-12] มีการคิดค้นนวัตกรรมใหม่ๆ เช่น ระบบน้ำวนควบคุมอุณหภูมิ และถาดเลี้ยงพลาสติก thermoformed ABS ที่สามารถเลี้ยงลูกน้ำยุงได้ครั้งละ 140,000 -175,000 ตัว เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยุง

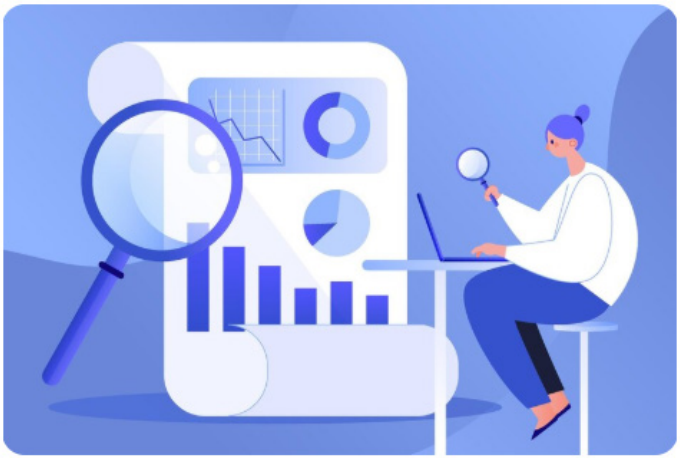
การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม (artificial membrane feeding) เป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีข้อดีหลายประการเมื่อเทียบกับการให้ยุงกินเลือดจากสัตว์ทดลองโดยตรง (13-14) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่า การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมสามารถทดแทนการใช้สัตว์ทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยยุงสามารถสืบพันธุ์และให้รุ่นลูกหลานได้ต่อเนื่อง [15-16]

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมกับการใช้สัตว์ทดลองโดยตรง พบว่าการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมมีข้อได้เปรียบที่สำคัญคือสอดคล้องกับหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองตามแนวทาง 3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) ซึ่งเป็นมาตรฐานสากลในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ [17-18] Russell และ Burch[17] ได้อธิบายว่าการลดการใช้สัตว์ทดลองไม่เพียงแต่สอดคล้องกับหลักจริยธรรมเท่านั้น แต่ยังส่งผลดีในแง่ของการลดต้นทุนและทรัพยากรในการดูแลสัตว์ทดลองอีกด้วย [19] นอกจากนี้ การให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมยังมีความปลอดภัยและความสะดวกมากกว่า [20] วิธีนี้ช่วยลดความเสี่ยงต่อการได้รับบาดเจ็บของทั้งสัตว์ทดลองและผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงลดโอกาสการติดเชื้อจากการสัมผัสสัตว์ [7] ข้อได้เปรียบอีกประการหนึ่งคือความสามารถในการควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้อย่างแม่นยำ Bousema และคณะ[21] พบว่าระบบการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมช่วยให้นักวิจัยสามารถควบคุมปริมาณและคุณภาพของเลือดตลอดจนการเติมสารต่างๆ ลงในเลือดได้ง่ายและแม่นยำ[22] นอกจากนี้ Gonzales และคณะ [14] ได้พัฒนาอาหารเทียม "SkitoSnack" ที่สามารถใช้แทนเลือดได้ โดยได้ทดสอบผลกระทบต่อวงจรชีวิตและจุลินทรีย์ในลำไส้ของยุงลายบ้าน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความก้าวหน้าในการพัฒนาอาหารเทียมสำหรับยุง

ปัจจัยสำคัญอีกประการที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมคือการเลือกใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากการศึกษาพบว่าพลาสมาให้ผลดีที่สุดในการกระตุ้นการวางไข่และการเจริญเติบโตของยุงลายบ้าน เนื่องจากมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่เหมาะสมต่อการพัฒนาไข่ของยุง โดยปราศจากเม็ดเลือดแดงที่อาจเสื่อมสภาพและส่งผลเสียต่อการสืบพันธุ์ของยุง[7] ในขณะที่สาร Sodium fluoride พบว่าสามารถยับยั้งการวางไข่ของยุงได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจเป็นข้อมูลที่นำไปสู่การพัฒนาวิธีการควบคุมประชากรยุงในอนาคต [14]

นอกจากสารกันเลือดแข็งแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อความสำเร็จในการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียม ได้แก่ อุณหภูมิของเลือด โดยMcMeniman และคณะ[23] พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการกินเลือดของยุงลายบ้าน อยู่ที่ 37-39°C ชนิดของเมมเบรนก็เป็นปัจจัยสำคัญ โดยพาราฟิล์มที่มีความหนา 15-30 ไมครอนให้ผลดีที่สุดสำหรับยุงลายบ้านi แหล่งที่มาและความสดของเลือดก็มีผลต่ออัตราการวางไข่และคุณภาพของไข่ โดย Phasomkusolsil และคณะ [24] พบว่ายุง *Anopheles dirus* ที่กินเลือดวัวให้จำนวนไข่มากกว่ายุงที่กินเลือดหมูและเลือดแพะ นอกจากนี้ปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ความชื้น แสง และระยะเวลาในการให้ยุงกินเลือด ก็มีผลต่อพฤติกรรมการกินเลือดและการวางไข่เช่นกัน โดย Costa-da-Silva และคณะ [16] พบว่าการให้ยุงกินเลือดในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง (70-80%) และในที่มืดหรือแสงสลัวจะเพิ่มอัตราการกินเลือด

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการใช้เมมเบรนเทียมจะมีข้อดีหลายประการ แต่ในบางกรณี ยุงอาจมีอัตราการกินเลือดต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการกินเลือดจากสัตว์มีชีวิต เนื่องจากขาดสิ่งกระตุ้นตามธรรมชาติ เช่น ความร้อนจากร่างกายสัตว์ กลิ่นตัว และคาร์บอนไดออกไซด์ [23, 25-26]



การพัฒนาระบบการให้เลือดผ่านเมมเบรนเทียมที่คำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการ องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในยุงพาหะนำโรคชนิดอื่นๆ เช่น Anopheles ซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อมาลาเรีย หรือ Culex ซึ่งเป็นพาหะนำเชื้อไข้สมองอักเสบเจอี เพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพสูงสุดซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยและการควบคุมโรคติดต่อนำโดยยุงในอนาคต

สรุปผล

การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 7 ชนิด (EDTA K3, Li-Heparin, Sodium fluoride, Sodium citrate, CPD, CPDA-1 และพลาสมา) ในการเลี้ยงยุงลายบ้าน ด้วยวิธีการให้เลือดผ่านเมมเบรน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในด้านอัตราการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตในทุกระยะ ชุดควบคุม (พลาสมา) แสดงประสิทธิภาพสูงสุดโดยให้จำนวนไข่ ดักแด้ และตัวเต็มวัยมากที่สุด การใช้พลาสมาที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเลือดเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและสะดวกกว่าการใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิดอื่นๆ องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในยุงพาหะนำโรคชนิดอื่นๆ เพื่อพัฒนาวิธีการเลี้ยงยุงในห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพสูงสุด อันจะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยด้านการควบคุมโรคติดต่อนำโดยยุงต่อไป

จริยธรรมการวิจัย

การดำเนินการทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับตัวอย่างยุงลายบ้าน เป็นไปตามมาตรฐานการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (หมายเลขการรับรอง 2022-NAT12-061, เลขที่โครงการ AUP Ref. AI089/2022) ภายใต้ใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์เลขที่ U1-06137-2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากบุคคลและหน่วยงานหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2560 ภายใต้โครงการพัฒนาวิธีการเลี้ยงยุงพาหะในห้องปฏิบัติการเพื่อการศึกษาโรคติดต่อนำโดยแมลง ขอขอบคุณ รศ.ดร.ธีรกมล เพ็งสกุล จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับความอนุเคราะห์แหล่งของเลือดและสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ และคำแนะนำอันมีค่าเกี่ยวกับการจัดการตัวอย่างเลือด ขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่อนุญาตให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง และภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ไข่ยุงลายบ้านสายพันธุ์ห้องปฏิบัติการสำหรับการศึกษานี้ ขอบคุณนักศึกษาระดับปริญญาโทที่ช่วยดูแลการเลี้ยงยุงและเก็บข้อมูลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Vannavong, N., R. Seidu, T. A. Stenstrom, N. Dada, and H. J. Overgaard. Effects of socio-demographic characteristics and household water management on *Aedes aegypti* production in suburban and rural villages in Laos and Thailand. Parasit. Vectors. 2017. 10: 170.

2. Wasinpiyamongkol, L., S. Patramool, S. Thongrungkiat, P. Maneekan, S. Sangmukdanan,D. Misse, and N. Luplertlop. Protein expression in the salivary glands of dengue-infected *Aedes aegypti* mosquitoes and blood-feeding success. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2012. 43: 1346-1357.

3. สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค . [อินเทอร์เน็ต]. ม.ค.-ธ.ค. 2561 [เข้าถึงเมื่อ 5 เมษายน 2561]. เข้าถึง ได้จาก: http://doe.moph.go.th/surdata/disease.php?dcontent=old&ds=262766

4. Sattabongkot, J., N. Maneechai, V. Phunkitchar, N. Eikarat, B. Khuntirat, J. Sirichaisinthop, et al.. Comparison of artificial membrane feeding with direct skin feeding to estimate the infectiousness of *Plasmodium vivax* gametocyte carriers to mosquitoes. Am. J. Trop. Med. Hyg.2003. 69: 529-535.

5. Pumidonming, W., P. Polseela, W. Maleewong, V. Pipitgool, and C. Poodendaen. *Culex quinquefasciatus* in Phitsanulok as a possible vector of nocturnally periodic *Wuchereria bancrofti* transmission in Myanmar immigrants. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 2005. 36: 176-179.

6. Pothikasikorn, J., M. J. Bangs, R. Boonplueang, and T. Chareonviriyaphap. Susceptibility of various mosquitoes of Thailand to nocturnal subperiodic *Wuchereria bancrofti.* J. Vector Ecol. 2008. 33: 313-320.

7. Pothikasikorn, J., R. Boonplueang, C. Suebsaeng, R. Khaengraeng, and T. Chareonviriyaphap. Feeding response of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* (Diptera: Culicidae) using out-of-date human blood in a membrane feeding apparatus. J. Vector Ecol. 2010. 35: 149-155.

8. Phasomkusolsil, S., K. Pantuwattana, J. Tawong, W. Khongtak, Y. Kertmanee, N. Monkanna, et al. The relationship between wing length, blood meal volume, and fecundity for seven colonies of Anopheles species housed at the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences, Bangkok, Thailand. Acta Trop. 2015. 152: 220-227.

9. บุญศรี มหากิตติคุณ. การเจาะเก็บเลือดและการใช้สารกันเลือดแข็ง. ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. . [อินเทอร์เน็ต] [เข้าถึงเมื่อ 27 เมษายน 2561] เข้าถึงได้จาก : http:// www.microscopy.ahs.chula.ac.th/newmicros/.../bloodcollecting.pdf.

10. Mamai, W., N. S. Bimbile-Somda, H. Maiga, J. G. Juarez, Z. A. Muosa, A. B. Ali, et al. Optimization of mosquito egg production under mass rearing setting: effects of cage volume, blood meal source and adult population density for the malaria vector, *Anopheles arabiensis.* Malar. J. 2017. 16: 41.

11. Balestrino, F., J. R. Gilles, S. M. Soliban, A. Nirschl, Q. E. Benedict, and M. Q. Benedict. Mosquito mass rearing technology: a cold-water vortex device for continuous unattended separation of *Anopheles arabiensis* pupae from larvae. J. Am. Mosq. Control Assoc.2011. 27: 227-235.

12. Balestrino, F., M. Q. Benedict, and J. R. Gilles. A new larval tray and rack system for improved mosquito mass rearing. J. Med. Entomol. 2012. 49: 595-605.

13. Gonzales, K.K. and I.A. Hansen. Artificial diets for mosquitoes. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2016. 13: 1267.

14. Gonzales, K.K., S.D. Rodriguez, H.N. Chung, M. Kowalski, J. Vulcan, E.L. Moore, et al. The effect of SkitoSnack, an artificial blood meal replacement, on *Aedes aegypti* life history traits and gut microbiota. Sci. Rep. 2018. 8: 11023.

15. Luo, Y.P. A novel multiple membrane blood-feeding system for investigating and maintaining Aedes aegypti and *Aedes albopictus* mosquitoes. J. Vector Ecol. 2014. 39: 271-277.

16. Costa-da-Silva, A.L., F.R. Navarrete, F.S. Salvador, M. Karina-Costa, R.S. Ioshino, D.S. Azevedo, et al. Gly-tube: A conical tube and Parafilm M-based method as a simplified device to artificially blood-feed the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti.* PLoS One 8: e53816. 2013.

17. Russell, W.M.S. and R.L. Burch. The principles of humane experimental technique. Methuen, London. 1959.

18. Balls, M., A.M. Goldberg, J.H. Fentem, C.L. Broadhead, R.L. Burch, M.F.W. Festing, et al. The three Rs: The way forward. Alternatives to Laboratory Animals.1995. 23: 838-866.

19. Mutero, C.M., J.H. Ouma, B.K. Agak, J.A. Wanderi, and R.S. Copeland. Malaria prevalence and use of self-protection measures against mosquitoes in Suba District, western Kenya. East Afr. Med. J. 2003. 80: 235-240.

20. Deng, L., S.Y. Koou, A.B. Png, L.C. Ng, and S.G. Lam-Phua. A novel mosquito feeding system for routine blood-feeding of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus.* Trop. Biomed. 2012. 29: 169-174.

21. Bousema, T., R.R. Dinglasan, I. Morlais, L.C. Gouagna, T. van Warmerdam, P.H. Awono-Ambene, et al. Mosquito feeding assays to determine the infectiousness of naturally infected Plasmodium falciparum gametocyte carriers. PLoS One 7: e42821. 2012.

22. Damiens, D., S.M. Soliban, F. Balestrino, R. Alsir, M.J. Vreysen, and J.R. Gilles. Different blood and sugar feeding regimes affect the productivity of *Anopheles arabiensis* colonies (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 2013. 50: 336-343.

23. McMeniman, C.J., R.A. Corfas, B.J. Matthews, S.A. Ritchie, and L.B. Vosshall. Multimodal integration of carbon dioxide and other sensory cues drives mosquito attraction to humans. Cell. 2014. 156: 1060-1071.

24. Phasomkusolsil, S., K. Tawong, W. Permpanich, Y. Pengruksa, S. Thammavong, K. Khanin, at al. Maintenance of mosquito vectors: effects of blood source on feeding, survival, fecundity, and egg hatching rates. J. Vector Ecol. 2013. 38: 38-45.

25. Takken, W. and N.O. Verhulst. Host preferences of blood-feeding mosquitoes. Annu. Rev. Entomol. 2013. 58: 433-453.

26. Lyimo, I.N., D.T. Haydon, T.L. Russell, K.F. Mbina, A.A. Daraja, E.M. Mbehela, et al. The impact of host species and vector control measures on the fitness of African malaria vectors. Proc. R. Soc. B. 2013. 280: 20122823.