Chulalongkorn Medical Journal

Volume 45
Issue 7 *July 2001*

Article 2

7-1-2001

Plasmodium-mosquito relationships: New hope for malaria control strategies

P. Siriyasatien

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation
Siriyasatien, P. (2001) "Plasmodium-mosquito relationships: New hope for malaria control strategies," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 45: Iss. 7, Article 2.
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol45/iss7/2

This Special Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

Chula Med J Vol. 45 No. 7 July 2001

ความสัมพันธ์ระหว่างยุงและเชื้อมาลาเรีย: ความหวังใหม่ในการควบคุมมาลาเรีย

เผด็จ สิริยะเสถียร*

Siriyasatien P. Plasmodium-mosquito relationships: New hope for malaria control strategies. Chula Med J 2001 Jul; 45(7): 561 - 7

Malaria remains a major cause of morbidity and mortality in many countries. Malaria parasite has to develop in the mosquito vector prior to transmit into the vertebrate host. The knowledge of mosquito-plasmodium relationships including gametocyte development and fertilization, transformation of zygote to ookinete, ookinete interaction and invasion of midgut epithelium, mosquito immune response against the malaria parasites, interaction between mosquito salivary gland and sporozoite could be used as targets for transmission-blocking in mosquito.

Key words: *Malaria, Plasmodium-mosquito relationships, Transmission blocking.*

Reprint request : Siriyasatien P. Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. March 10, 2001.

* ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาลาเรียยังเป็นโรคซึ่งก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสาธารณสุขในหลายประเทศ ในแต่ละปีมีผู้ป่วยด้วยมาลาเรียประมาณ 300 - 500 ล้านคนทั่วโลก และมีผู้เสียชีวิตประมาณปีละ 3 ล้านคน[1] มีความพยายามหลายด้านเพื่อที่จะควบคุมมาลาเรีย เช่น การคิดค้นยาใหม่ ๆ เพื่อใช้รักษามาลาเรีย การค้นคว้าหาวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันมาลาเรีย และการควบคุมยุงก้นปล่องซึ่งเป็นพาหะของโรค แต่ความพยายามดังกล่าวกลับไม่ได้ผลเท่าที่ควรทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุดังต่อไปนี้

1. ปัญหาการดื้อยาของเชื้อมาลาเรีย

ถึงแม้ว่าจะมีการค้นคว้าหายาตัวใหม่ ๆ มาใช้ในการรักษามาลาเรียแต่เชื้อมาลาเรียมีอัตราของการดื้อยาอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ยาเกินความจำเป็นทำให้เกิดการคัดเลือกมาลาเรียสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา รวมทั้งการอพยบย้ายถิ่นของประชากรซึ่งจะนำเชื้อที่ดื้อยาไปสู่แหล่งที่ไม่มีเชื้อดื้อยามาก่อน

2. ปัญหาของการค้นคว้าวัคซีนป้องกันมาลาเรีย

ถึงแม้ว่าจะได้มีการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับวัคซีนเพื่อใช้ป้องกันมาลาเรียมานับเป็นสิบปี แต่ว่ายังไม่สามารถที่จะพัฒนาเพื่อให้ได้วัคซีนที่มีประสิทธิภาพดีเพียงพอ สาเหตุหนึ่งเนื่องจากมาลาเรียมี antigenic variation มากทำให้เกิดความลำบากในการสร้างวัคซีนเพื่อให้ครอบคลุมเชื้อได้ทั้งหมด antigen หลายตัวถูกเลือกเพื่อพัฒนาเป็นวัคซีน เช่น Circumsporozoite Protein (CSP), Merozoite Surface Protein (MSP) แต่วัคซีนเหล่านี้ยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ การพัฒนา DNA วัคซีนสำหรับป้องกันมาลาเรียกำลังอยู่ในระหว่างการทดลองใช้ในคน ซึ่งยังคงต้องใช้เวลารอผลการศึกษาอีกระยะหนึ่งก่อนที่จะนำมาใช้

3. ปัญหาการควบคุมยุงพาหะ

การควบคุมยุงพาหะก็เป็นอีกหนทางหนึ่งซึ่งใช้ในการควบคุมมาลาเรีย การใช้ DDT เพื่อกำจัดแมลงเริ่มในปี ค.ศ. 1940 ได้มีการใช้ DDT ไปทั่วโลก โดยเฉพาะแหล่งของโรคมาลาเรีย ไข้เหลือง และไข้เลือดออก ถึงแม้ว่าการใช้ DDT จะสามารถควบคุมแมลงพาหะได้ดีในช่วงแรก แต่เพียง 20 ปีหลังจากการเริ่มใช้ ได้มีการพบว่ามีแมลงที่ดื้อต่อ DDT เกิดขึ้น และแม้ว่าจะมีการสังเคราะห์สารกำจัดแมลงชนิดอื่นเช่น สารกลุ่ม organophosphates และ carbamates ขึ้นมา แต่ก็มีแมลงที่ดื้อต่อสารดังกล่าวตามมาอีก นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่น ๆ ตามมา เนื่องจากการใช้สารกำจัดแมลง เช่น ปัญหาความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงต่อคนและสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นพิษที่เกิดต่อคนโดยตรง โดยการสัมผัสหรือสูดหายใจ หรือเป็นปัญหาระยะยาวคือมีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม และปะปนมากับอาหาร นอกจากปัญหาความเป็นพิษดังกล่าวแล้วข้อเสียที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการใช้สารกำจัดแมลงคือสารเหล่านี้จะทำลายแมลงที่มีประโยชน์ไปด้วย ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพนิเวศน์วิทยาตามมา

จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นทำให้การควบคุมมาลาเรียไม่ได้ผลเท่าที่ควร ปัญหาของการค้นคว้าหายาหรือวัคซีนเพื่อนำมาใช้ควบคุมโรคให้ได้ผลยังคงต้องใช้เวลาอีกนานพอควร หนทางที่น่าจะใช้ได้ดีที่สุดทางหนึ่งน่าจะเป็นเรื่องของการควบคุมแมลงพาหะ แต่จากปัญหาของสารกำจัดแมลงดังที่กล่าวมาแล้วทำให้มีการนำการควบคุมแมลงพาหะวิธีอื่น ๆ มาใช้ เช่น การควบคุมโดยชีววิธี (Biological control) การควบคุมโดยการปรับปรุงสภาพแวดล้อม (Environmental control) แต่วิธีการเหล่านี้ก็ยังมีข้อจำกัดในการใช้อยู่มากทำให้ใช้ไม่ได้ผลเท่าที่ควร ทางเลือกอีกทางหนึ่งซึ่งมีความเป็นไปได้สูงคือการพัฒนายุงสายพันธุ์ที่ไม่มีความเป็นพาหะ แล้วปล่อยยุงเหล่านี้ออกสู่ธรรมชาติเพื่อทดแทนยุงพาหะ ซึ่งการที่จะพัฒนายุงสายพันธุ์ดังกล่าวได้จะต้องอาศัยความรู้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างยุงและเชื้อมาลาเรียและความรู้ทางด้านการสร้างยุงข้ามพันธุ์ (transgenic mosquitoes) ประกอบกัน ซึ่งในบทความนี้จะกล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างยุงกับเชื้อมาลาเรียและแนวทางที่จะใช้ในการควบคุมโรคในอนาคต

Malaria Development in Mosquito

มาลาเรียในกระแสเลือดของ vertebrate hosts จะมีอยู่ 2 แบบคือ asexual และ sexual form ซึ่งจะพบในแบบของ asexual form มากกว่า สาเหตุที่มาลาเรียเปลี่ยนจาก asexual form มาเป็น sexual form นั้นยังไม่แน่ชัด การเปลี่ยนแปลงของเชื้อมาลาเรียในยุงพาหะนั้นเริ่มจากการที่ยุงไปกินเลือดที่มี gametocytes (sexual form) อยู่ จากนั้นเชื้อมาลาเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะต่าง ๆ ได้แก่ gamete (male and female), zygote, ookinete, oocyst and sporozoite [2,3]

The sexual cycle and exflagellation

ภายในระยะเวลาไม่กี่นาทีหลังจากดูดกินเลือด เซลล์ในทางเดินอาหารของยุง (midgut cells) จะหลั่ง Peritrophic Matrix (PM) ออกมา PM ซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนและ chitin จะทำหน้าที่แยกเลือดออกจาก midgut epithelium (รูป1B) เชื่อกันว่า PM มีส่วนช่วยป้องกันไม่ให้เชื้อโรคที่ปะปนมากับเลือดสัมผัสกับผิวเซลล์โดยตรง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่แยกเลือดและเอ็นไซม์ที่จะทำหน้าที่ย่อยเลือดออกจาก epithelial cells[4,5] เชื้อมาลาเรียระยะ gametocyte (ซึ่งขณะนี้อยู่ในเลือดที่ล้อมรอบด้วย PM) จะพัฒนาเป็นระยะ gamete โดย male gametocyte จะพัฒนาได้ 8 motile haploid gametes ด้วยขบวนการที่เรียกว่า exflagellation (รูป1A) เชื้อมาลาเรียที่เลี้ยงในห้องทดลองสามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการ exflagellation ได้โดย 1) ลดอุณหภูมิจาก 37°C ลงเป็น 28°C 2) เพิ่ม pH จาก 7.5 เป็น 8.2 หรือ 3) การกระตุ้นด้วย gametocyte-activating factor (GAF) GAF ที่สกัดมาจากทางเดินอาหารของยุงสามารถกระตุ้นให้เกิด exflagellation ในหลอดทดลองได้ จากการศึกษาพบว่า GAF นี้ก็คือ xanthurenic acid[6,7] แต่ปัจจุบันยังไม่เป็นที่รู้แน่ชัดว่าขบวนการ exflagellation ในยุงนั้นถูกกระตุ้นด้วยขบวนการใด การศึกษาขบวนการ exflagellation นี้มีความสำคัญมาก ซึ่งหากเราสามารถยับยั้งขบวนการ exflagellation ได้ก็สามารถยับยั้งการผสมพันธุ์ระหว่าง male และ female gamete ซึ่งจะเป็นการยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อมาลาเรียได้

ระหว่างการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียในทางเดินอาหารของยุงนั้นเชื้อมาลาเรียจะมีการสร้างแอนติเจนซึ่งปกติจะไม่มีการสร้างแอนติเจนชนิดนี้ใน vertebrate hosts เช่น Pbs21 จาก *Plasmodium berghei* หรือ Pfs25 และ Pfs28 ที่ได้จาก *P. falciparum* จากการทดลองพบว่า antibodies ต่อเอนติเจนดังกล่าวสามารถยับยั้งการพัฒนาของเชื้อมาลาเรียใน midgut ของยุงได้[8,9] ปัจจุบันมีได้การพัฒนาวัคซีนเพื่อกระตุ้นให้คนสร้างภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนดังกล่าวซึ่งจัดเป็น transmission blocking vaccines รวมทั้งได้มีความพยายามที่จะส่งถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างแอนติเจน (Pbs21) เข้าไปในยุงเพื่อให้ยุงเป็นพาหะนำวัคซีนไปสู่คนซึ่งเมื่อยุงไปดูดเลือดผู้ที่มีแอนติบอดีต่อ Pbs21 อยู่เชื้อมาลาเรียก็ไม่สามารถเจริญในยุงที่ได้รับแอนติบอดีนี้ได้[10]

The ookinete traverses the peritrophic matrix

หลังจากที่มีการผสมพันธุ์ระหว่าง male และ female gamete แล้ว zygote ที่ได้จะมีการพัฒนาต่อไปเป็นระยะ ookinete ซึ่งเคลื่อนไหวได้ ookinete จะเคลื่อนที่ออกจาก PM (รูป1C) การที่ ookinete สามารถผ่านผนังของ PM ออกมาได้ทั้งที่ผนังของ PM ค่อนข้างหนา เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของ ookinete เนื่องจาก ookinete หลั่งเอ็นไซม์ chitinase ออกมา (ผนังของPM ประกอบไปด้วย โปรตีนและ chitin) การหลั่ง chitinase ของ ookinete นี้ถูกกระตุ้นโดย trypsin จาก ทางเดินอาหารของยุง มีการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ anti-trypsin แอนติบอดี ไปยับยั้งการทำงานของ trypsin ในทางเดินอาหารของยุงสามารถยับยั้งไม่ให้ ookinete ผ่านออกมาจาก PM ได้ [11-13] trypsin จึงเป็นเอนติเจนอีกอย่างหนึ่งที่น่าจะมาพัฒนาเป็น transmission blocking vaccine ได้ ในทำนองเดียวกันกับ trypsin การยับยั้งการทำงานของ chitinase ด้วย anti-chitinase antibody ก็น่าจะช่วยลดอัตราการถ่ายทอดของเชื้อมาลาเรียได้[3,14]

ระบบภูมิคุ้มกันของยุงก็มีการตอบสนองต่อเชื้อ

มาลาเรียโดยมีการสร้างแคปซูลซึ่งสร้างโดย hemocytes (เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่งของยุง) มาหุ้มเชื้อซึ่งสามารถฆ่า ookinetes ได้ การกระตุ้นระบบ humoral immune response ของยุงโดยการฉีดเชื้อแบคทีเรียบางชนิดซึ่งเป็นการกระตุ้นให้ยุงหลั่งสารที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อแบคทีเรียเช่น defensins, cecropins, proline-rich และ glycine-rich peptides ออกมา โดยเฉพาะ defensins ซึ่งได้มีการพิสูจน์ว่าสามารถลดปริมาณ oocyst ที่ฝังตัวใน midgut ของยุงได้ แสดงว่า defensins มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาลาเรียในระยะ preoocyst ได้[15]

Ookinete invasion of the midgut epithelium

เมื่อ ookinete ผ่าน PM ออกมาแล้วจะต้องผ่าน midgut epithelial อีกชั้นหนึ่งเพื่อไปฝังตัวอยู่ที่ชั้น basal lamina แล้วจึงเจริญเป็นระยะ oocyst ต่อไป ookinete ส่วนใหญ่จะผ่าน epithelium cell ที่เรียกว่า Ross cell เซลล์นี้ต่างจาก midgut epithelium cell อื่น ๆ คือจะมีจำนวนของ microvilli น้อยกว่าและติดสีจางกว่าเมื่อย้อมด้วย toluidine blue นอกจากนี้ยังมีปริมาณ vesicular ATPase มากกว่าเซลล์อื่น ๆ ookinete จะไปจับกับ microvilli ก่อน จากนั้นจึงจะเริ่มแทรกเข้าไปในเซลล์ ส่วนกลไกในที่เกี่ยวข้องในการที่ ookinete จับกับ microvilli ของ Ross cell ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในยุงลาย (*Aedes aegypti*) สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรีย (*P. gallinaceum*) ได้ต่างกันพบว่ายีนบน โครโมโซมที่ 2 และ 3 มีผลต่อความเป็นพาหะของยุงต่อเชื้อมาลาเรียโดยที่เชื้อมาลาเรียไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะ oocyst ได้ แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบว่ากลไกว่ายีนเหล่านี้ออกฤทธิ์ได้อย่างไร[16]

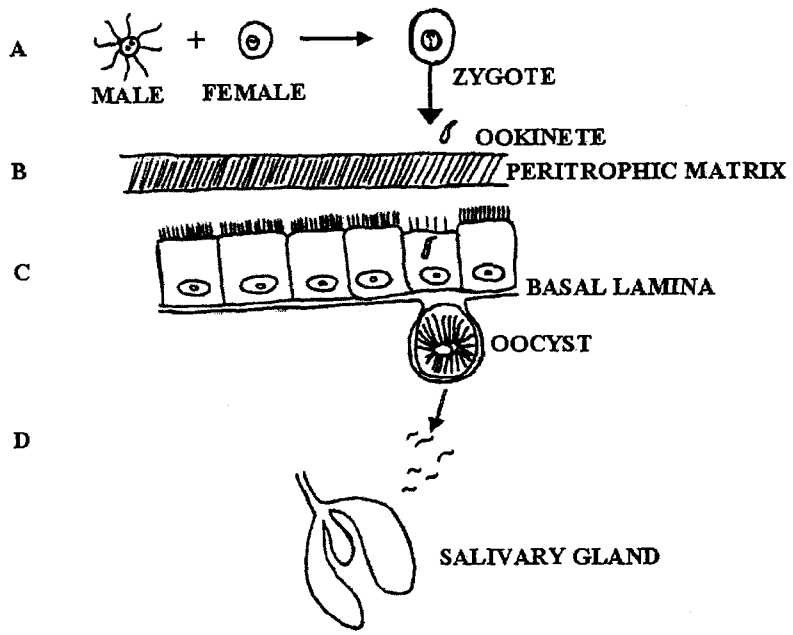

Figure 1. Plasmodium development in the mosquito. Gametocytes are released from erythrocytes and transform into female and male gamete within minutes after ingested by the mosquito. A male gamete fertilizes a female gamete to produce a zygote, the zygote then develops into an ookinete (A). The ookinete penetrates peritrophic matrix (PM) and the midgut epithelium (preferentially Ross cell) and remains between midgut epithelium and basal lamina, where it differentiates into an oocyst (B and C). At some time between Days 10-24, the oocyst ruptures and releases thousands of sporozoites into the hemolymph. Sporozoites invade only distal lateral and medial salivary gland lobes and released into the vertebrate host during the mosquito take a bloodmeal (D).

Development of oocysts

เมื่อ ookinete แทรกผ่าน midgut epithelium cell แล้วจะแทรกตัวอยู่ระหว่าง epithelium cell กับ basal lamina จากนั้นจึงพัฒนาต่อไปเป็นระยะ oocyst หลังจากนั้นประมาณ 10 - 24 วัน oocyst จะพัฒนาได้ sporozoites จำนวนมาก เมื่อ oocyst แตกจะปล่อย sporozoites เหล่านี้ออกมา sporozoites ที่แตกออกมาจะแทรกผ่านชั้น basal lamina ออกมาสู่ hemocoel (ช่องว่างในลำตัวแมลง) และเดินทางไปสู่ต่อมน้ำลายของยุงต่อไป (รูป1D)

ยุงบางชนิดจะสร้างเมลานินมาหุ้ม oocyst (menalotic encapsulation) ไว้ ซึ่งจะทำให้ oocyst ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ จากการศึกษาทำให้สามารถแยกยีนที่ควบคุมการสร้างเมลานินนี้ได้ก็คือ *Pen1*, *Pen2* และ *Pen3*[17] เนื่องจากยีนเหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาบทบาทของมันต่อการสร้างเมลานินในระดับโมเลกุลจึงไม่ทราบขั้นตอนในการที่ยีนเหล่านี้สามารถควบคุมการสร้างเมลานินว่าเกิดได้อย่างไร

Sporozoite invasion of the salivary gland

เมื่อ sporozoites เข้ามาอยู่ใน hemocoel มันจะเดินทางไปแทรกตัวอยู่ที่เซลล์ต่อมน้ำลายยุงมากกว่าอวัยวะอื่น ๆ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่า sporozoites มีความจำเพาะต่อต่อมน้ำลายยุงจึงจะต้องไปเจริญที่ต่อมน้ำลายของยุงก่อนที่จะถ่ายทอดไปสู่ vertebrate host ต่อไป sporozoites จะเจริญเฉพาะที่ต่อมน้ำลายส่วนกลาง (median lobe) และ ต่อมน้ำลายด้านข้างส่วนปลาย (distal lateral lobe) เท่านั้น [18] มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า lectins และแอนติบอดีต่อ epitopes บนผิวเซลล์ต่อมน้ำลายสามารถยับยั้งไม่ให้ sporozoites เข้าไปเจริญในต่อมน้ำลายได้[19] จากการศึกษาถึงปริมาณการสังเคราะห์ Thrombospondin-Related Anonymous Protein (TRAP) พบว่า ปริมาณของ TRAP เพิ่มขึ้นตามอายุของ sporozoite เมื่อมีการใช้ sporozoites ซึ่งมี knockout ยีนต่อ TRAP พบว่า sporozoites เหล่านี้ไม่สามารถจะแทรกตัวเข้าไปใน basal lamina ของต่อมน้ำลายได้ แสดงว่า TRAP เป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการแทรกตัวของ sporozoites เข้าไปในต่อมน้ำลายยุง[20]

เมื่อ sporozoite แทรกผ่านชั้น basal lamina ของต่อมน้ำลายยุงแล้วจะพักตัวอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ต่อมน้ำลายเป็นระยะสั้น ๆ หลักจากนั้นจึงจะแทรกผ่านไปอีกด้านหนึ่งของเซลล์ต่อมน้ำลายซึ่งก็คือทางเดินน้ำลายที่จะเป็นทางนำ sporozoites เหล่านี้ไปสู่ vertebrate host ในขณะที่ยุงดูดกินเลือด

บทสรุปและแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

จะเห็นได้ว่าการเจริญและพัฒนาเป็นระยะต่าง ๆ ของเชื้อมาลาเรียภายในตัวยุงจะมีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง เอ็นไซม์และโปรตีนต่าง ๆ ความรู้เรื่องความสัมพันธ์ระหว่างยุงและเชื้อมาลาเรียรวมทั้งปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการคัดเลือกหรือสร้างยุงสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเป็นพาหะของมาลาเรีย ปัจจุบันได้เทคนิคการสร้างยุงข้ามพันธุ์ (transgenic mosquitoes) ได้มีการพัฒนาไปมาก เช่น ในยุง *Anopheles stephensi* มีการส่งถ่ายดีเอ็นเอซึ่งควบคุมการสร้างสารเรืองแสงสีเขียว (Green Fluorescent Protein, GFP) ที่โคลนมาจากแมงกระพรุน (*Aequorea victoria*) โดยอาศัย *Minos* transposable element เป็นตัวนำดีเอ็นเอไปสู่โครโมโซมของยุง ซึ่งยุงข้ามพันธุ์ดังกล่าวสามารถเรืองแสงสีเขียวและยีนซึ่งควบคุมการสร้าง GFP ยังสามารถถ่ายทอดไปสู่ยุงรุ่นต่อไปได้[21] นอกจากนี้ยังมีการทำ transformation ในยุง *Aedes aegypti* โดยอาศัย *Hermes* transposable element เป็นตัวนำยีนซึ่งควบคุมการสร้าง defensin A พบว่ายุงข้ามพันธุ์เหล่านี้สามารถสร้าง defensin ได้ และยีนซึ่งควบคุมการสร้าง defensin A ก็สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อๆไปได้เช่นกัน[22] จะเห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้มากในการที่จะพัฒนายุงข้ามพันธุ์ ซึ่งไม่มีความเป็นพาหะของเชื้อมาลาเรียโดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีนที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียแล้วปล่อยยุงเหล่านี้ไปทดแทนยุงพาหะในธรรมชาติ

อ้างอิง

1. World Health Organization. Disease statistics. The World Health Report. World Health Organisation. Geneva, Switzerland : 1999.
2. Beier JC. Malaria parasite development in mosquitoes. Ann Rev Entomol 1998 43: 519 - 43
3. Ghosh A, Edwards MJ, Jacobs-Lorena M. The journey of the malaria parasite in the mosquito: Hope for the New Century. Parasitol Today 2000 May; 16(5): 196 - 201
4. Jacobs-Lorena M, Oo M-M. The peritrophic matrix of insects. In : Beaty BJ, Marquardt W, eds. The Biology of Disease Vectors. Cotorado: University Press of Colorado, 1996: 318 - 32
5. Tellam RL. The peritrophic matrix. In : Lehane MJ, Billingstey PF, eds. Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall, 1996: 86 - 114
6. Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei in vitro. Parasitology 1997 Jul; 115(Pt 1): 1 - 7
7. Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. Nature 1998 Mar 19; 392(6673): 289-92
8. Margos G, van Dijk MR, Ramesar J, Janse CJ, Waters AP, Sinden RE.Transgenic expression of a mosquito-stage malarial protein, Pbs21, in blood stages of transformed Plasmodium berghei and induction of an immune response upon infection. Infect Immun 1998 Aug; 66(8): 3884-91
9. Gozar MM, Price VL, Kaslow DC. Saccharomyces cerevisiae-secreted fusion proteins Pfs25 and Pfs28 elicit potent Plasmodium falciparum transmission-blocking antibodies in mice. Infect Immun 1999 Jan; 66(1):59 - 64
10. Crampton JM, Stowell SL, Karras M, Sinden RE. Model system to evaluate the use of transgenic haematophagous insects to deliver protective vaccines. Parasitologia 1999 Sep; 41(1-3): 473-7
11. Shahabuddin M, Toyoshima T, Aikawa M, Kaslow DC. Transmission-blocking activity of a chitinase inhibitor and activation of malarial parasite chitenase by mosquito protease. Proc Natl Acad Sci USA 1993 May 1;90(9): 4266-70
12. Shahabuddin M, Lemos FL, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M. Antibody-mediated inhibition of Aedes aegypti midgut trypsins blocks sporogonic development of Plasmodium gallinaceum. Infect Immun 1996 Mar; 64(3): 739-43
13. Shahabuddin M, Cociancich S, Zieler H. The search for novel malaria transmission-blocking targets in the mosquito midgut. Parasitol. Today 1998 Feb; 14(2): 493 - 7
14. Billingsley PF. Vector-parasite interactions for vaccine development. Int J Parasitol 1994 Feb; 24(1): 53 - 8
15. Lowenberger CA, Kamal S, Chiles J,Paskewitz S, Bulet P. Mosquito-Plasmodium interactions in response to immune activation of the vector. Exp Parasitol 1999 Jan; 91(1): 59 - 69
16. Severson DW, Thathy V, Mori A, Zhang Y, Christensen BM. Restriction fragment length

polymorphism mapping of quantitative trait loci for malaria parasite susceptibility in the mosquito Aedes aegypti. Genetics 1995 Apr; 139(4): 1711 - 7

17. Gorman MJ, Severson DM, Cornel AJ, Collins FH, Paskewitz SM. Mapping a quantitative trait locus involved in melanotic encapsulation of foreign bodies in the malaria vector Anopheles gambiae. Genetics 1997 Jul; 146 (3): 965 - 71

18. Sterling CR, Aikawa M, Vanderberg JP, The passage of Plasmodium berghei sporozoites through the salivary gland of Anopheles stephensi: an electron microscopic study. J Parasitol 1973; 59: 593 - 605

19. Barreau C, Touray M, Pimenta PF, Miller LH, Vernick KD. Plasmodium gallinaceum: sporozoite invasion of Aedes aegypti salivary glands is inhibited by anti-gland antibodies and by lectins. Exp Parasitol 1995 Nov; 81(3): 332-43

20. Wengelnik K, Spaccapelo R, Naitza S, Robson KJ, Janse CJ, Bistoni F, Waters AP, Crisanti A. The A-domain and the thrombospondin-related motif of Plasmodium falciparum TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. EMBO J 1999 Oct 1; 18(19): 5195 - 204

21. Catteruccia F, Nolan T, Loukeris TG, Blass C, Savakis C, Kafatos FC, Crisanti A. Stable germline transformation of the malaria mosquito Anopheles stephensi. Nature 2000 Jun 22; 405(6789): 959 - 62

22. Kokoza V, Ahmed A, Cho WL, Jasinskiene N, James AA, Raikhel A. Engineering blood meal-activated systemic immunity in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. Proc Natl Acad Sci USA 2000 Aug 1; 97(16): 9144-9