مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی
دوره ۷ شماره ۲ تابستان ۱۳۸۸ ، صفحات : ۸۳-۷۷

سن آنوفل استفنسی ناقل مهم مالاریا، به روش کروماتو گرافی مایع (HPLC)

دکتر حمیده عدالت: استادیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
محمد آخوندی: دانشجو دوره کارشناسی ارشد، گروه حشره شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
محمد رضا عبایی: مربی، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
ماندان ابوالحسنی: کارشناسی ارشد، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
دکتر سید محمد تقی صادقی: دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
دکتر سید موسی کاظمی : استادیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
دکتر حمید رضا باصری: دانشیار، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین ، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط: basserih@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۳۸۷/۷/۲۹ تاریخ پذیرش : ۱۳۸۸/۵/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: بررسی و تعیین سن روزانه آنوفل استفنسی با توجه به تغییر غلظت پتردین های موجود در کوتیکول پشه های ماده به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع(HPLC).

روش کار: پشه های استفنسی ماده در شرایط انسکتاریوم (دمای ۲۸ درجه و رطوبت ۷۰ ٪) پرورش داده شد و گروه های ده تایی از جمعیت آن با سنین ۵،۱، ۱۰،۱۵، ۲۰، ۲۵ و۳۰ روزه در دسته بندی شد و از هر گروه سنی نیز جداگانه سه دسته ده تایی برای استخراج پتریدین کوتیکول مورد استفاده قرار گرفت. جهت استخراج و شناسایی پتردین ها از دستگاه کروماتوگراف مایع(HLPC) مجهز به آشکارساز فلوورسانس استفاده گردید. کروماتوگرام های پتریدین بدست آمده در طول موجهای Emotion =355nm & Excitation =465nm تعیین شده و جهت تعیین نوع با کروماتوگراف های استاندارد مقایسه شدند.

نتایج: در این مطالعه چهار نوع پتردین Biopteridin ،Pteridin – 6 carboxylic acid ،Isoxanthopteridin Xanthopteridin در جلد پشه های آنوفل استفنسی پیدا شد. اگر چه این چهار نوع پتردین در کل جلد بدن پشه ها یافت شد ولی Biopteridin در سر و Xanthopteridn در سینه مشاهده نگردید. علاوه بر این با افزایش روزانه سن پشه ها میزان پتریدین ها کاهش یافته و یا بتدریج به نوع دیگری تغییر کردند، بطوریکه در طی ۳۰ روز ، نه برابر کاهش در غلظت کل پتردین ها مشاهده شد.

نتیجه گیری: تعیین سن پشه‌های ناقل در مطالعات اپیدمیولوژیک بسیاری از بیماری‌های منتقل‌شونده توسط آنها، مانند ویروس ها و انگل‌ها، اهمیت بسزایی دارد. در این مطالعه افزایش سن روزانه پشه با کاهش میزان پتریدین رابطه معکوس داشت. لذا این روش با توجه به دقت بالا کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارساز فلوورسانس می تواند به عنوان یک روش استاندارد برای تعیین سن روزانه گونه های مختلف آنوفلینی و یا سایر پشه مورد استفاده قرار بگیرد. بخصوص که در این روش نیاز به تعداد زیاد نمونه نمی باشد و در عین حال سرعت و دقت آن بالا است. محدودیت عمده این روش ، عدم دسترسی آسان به دستگاه HPLC در بسیار از نواحی کشور می باشد ولی با توجه به قابلیت نگهداری و استفاده از پشه های مرده و منجمد شده، امکان ارسال نمونه به مراکز دارای دستگاه HPLC می باشد.

واژگان کلیدی:آنوفل استفنسی، پتردین، تعیین سن، کروماتوگرافی مایع

مقدمه

طول عمر حشرات ناقل از عوامل مهم در انتقال بیماری های منتقله توسط حشرات و بالطبع اپیدمیولوژی آنها محسوب می شود. روش های متعددی برای تعیین سن ناقلین ذکر شده که بسته به نوع حشره و شیوه زیستی آنها متفاوت می باشد. تعیین سن براساس اندازگیری میزان پتریدین فلورسنت مترشحه کوتیکول حشرات اولین بار در سال ۱۹۸۳ بر روی رنگدانه های موجود در بال *Stomoxys calsitrance* آغاز شد(Mait et al. 1983) و با مطالعه همین دو محقق در سال ۱۹۸۵ بر روی تعیین سن مگسهای *Glossina morsitans morsitans* با تکنیک جدید ، این روش تعیین سن ادامه یافت . در سال ۱۹۸۸ با ادامه مطالعات توسط Mail& Lehane بر روی شناسایی رنگدانه های موجود در کپسول سر مگسهای *Stomoxys calcitrance* گام دیگری در تکمیل روش تعیین سن بر اساس رنگدانه های موجود در قسمت های مختلف بدن برداشته شد که در آن طیف رنگهای حاصل از تزریق کپسول سر به روش کروماتوگرافی ترسیم شد (Mail and Lehane 1988).

یکی از روش های متداول تعیین سن پشه ها که بیش از ۵۰ سال است که به عنوان روش اصلی برای تعیین سن ناقل بکار می رود روش شمارش تعداد دیلاتاسیون در اواریول تخمدان پشه ها است که برای تخمین سن فیزیولوژی پشه ها (تعداد سیکل گونوتروفیک طی شده) می باشد که اساس این روش توسط Polovodova پی ریزی شد و بعداً توسط Detinova ادامه یافت. (Fox and Brust 1994)

این روش خصوصاً برای اپیدمیولوژیست ها و اکولوژیست ها مفید بود زیرا که می توانستند جمعیت پشه ها را بر اساس تکرر خون خواری و دفعات تخمگذاری (سیکل گونوتروفیک) تفکیک کنند(Polovodova 1949; Detimova 1962).

در مجموع عمده مطالعات تعیین سن بر اساس رنگدانه های موجود در قسمتهای مختلف بدن بویژه سر مدیون زحمات و تلاشهای دو محقق Mail & Lehane بوده است که با عناوین تعیین سن در سالهای ۱۹۸۸ و ۱۹۹۱ بر روی مگس Tsetse (Msangi and Lehane 1991) و در سال ۱۹۹۲ بر روی *Simulium damnosom* انجام گرفت (Millest et al. 1992) . نظر به اهمیت کاربرد روشهای جدید برای تعیین سن حشرات مهم از نظر پزشکی ، نخستین بار در سال ۱۹۹۵ توسط پژوهشگران نامبرده با استفاده از کروماتوگرافی مایع *Culicoides variipennis* از خانواده سراتوپوگونیده تعیین سن انجام گردید (Mullens and Lehane 1995). به دنبال آن با توجه به اهمیت زیرخانواده آنوفلینی (جنس آنوفلس) و نقش آنها در انتقال بیماری، مطالعاتی نیز در خصوص تعیین سن این زیرخانواده با استفاده روشهای جدید مانند کروماتوگرافی مایع انجام گردید و پس از آن تمامی مطالعات بر روی حشرات مهم از نظر پزشکی از جمله زیرخانواده آنوفلینه متمرکز شد بطوریکه در آخرین مطالعات انجام شده توسط محققین مذکور میزان ترشح پتریدین در آنوفلهای استفنسی و گامبیه (دو ناقل مهم بیماری مالاریا) با استفاده از کروماتوگرافی مایع اندازگیری و مقایسه شدند.

اخیراً با استفاده از میزان تجمع پتریدین در سر و سینه آنوفلهای استفنسی و گامبیه موفق به تعیین سن جمعیتهای انسکتاریوم این گونه ها شده اند (Wu and Lehane 1999) در مطالعه ای دیگر به کمک دستگاه HPLC تجمع پتریدین را بررسی و تفاوت در غلظت ماده مذکور در سر و سینه آنوفل گامبیه بررسی شد. متعاقباً در بررسی دیگر با استفاده از دستگاه HPLC تجمع پتریدین در سر و سینه و شکم آنوفل آلبی مانوس به منظور تعیین سن روزانه آن بررسی شد(Penilla et al. 2002) در این مطالعه مشخص گردید که تکرار خونخواری بر روی غلظت پتریدین موثر بوده و ارتباط معنی داری بین سن و خونخواری وجود دارد. با توجه به این که در این زمینه هیچ مطالعه ای روی آنوفل استفنسی خصوصاً با استفاده از دستگاه HPLC در ایران صورت نگرفته است. براین اساس تعیین سن با استفاده از

دستگاه حساس و دقیق HPLC برای اولین بار در کشور انجام می‌گیرد.

روش کار

پرورش پشه ها: پشه های بالغ آنوفل استفنسی مورد نیاز جهت این مطالعه در انسکتاریوم با شرایط استاندارد بدین شرح پرورش داده شد. میزان رطوبت انسکتاریوم بین ۷۵-۶۵ درصد و حرارت مناسب برای پرورش پشه های آنوفل در حدود ۲۹-۲۸ درجه سانتیگراد بود. علاوه بر این برای پرورش پشه های آنوفل از نور لازم با دوره ۱۲ ساعت روز و ۱۲ ساعت شب استفاده گردید. برای تغذیه کلیه مراحل لاروی آنوفل از پودر خوراک ماهی استفاده شد. علاوه بر آن تغذیه پشه های بالغ در حالت عادی با محلول ۱۰ درصد شکر در آب اجام گرفت و برای افزایش جمعیت کلنی از خون خوکچه هندی بطور مستقیم و با دوره زمانی سه بار در هفته انجام گرفت. در این بررسی بطور کلی در هر بار تکرار ۲۱۰ عدد آنوفل ماده که فقط با آب قند تغذیه شده بودند مورد استفاده قرار گرفت، که در گروه های ۱۰ تایی بصورت جداگانه برای استخراج پتردین از کل بدن و یا سر و سینه مورد استفاده قرار گرفت. لذا از پشه هایی با سنین ۱، ۵، ۱۰،۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روزه در داخل اپندورفهایی جداسازی شدند تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به صورت خشک نگهداری گردید.

تنظیم سیستم HPLC: جهت تعیین پتردین در این تحقیق، دستگاه کروماتو گرافی مایع (HPLC) ساخت شرکت Knauer با شرایط ذیل تنظیم گردید. در راستای فاز متحرک از متانول و آب مقطر خاص HPLC (آب مقطر دوبار تقطیر با درجه بالا) با نسبتهای ۷۰٪ به ۳۰٪ از متانول و آب استفاده شد و میزان Flow rate=1ml/min و طول موج آشکارساز فلوئورسانس برای پتردین بر اساس روش کار(Excitation=455 nm و Emotion=365nm)، ستون مورد استفاده C_8 با اندازه ۴/۶ ×۲۵۰ میلی متر جنس آن از Shodex بود.

استخراج پتردین: در این مطالعه جهت بهینه کردن سیستم کروماتو گرافی مایع ابتدا از پتردین های استاندارد خریداری شده از کمپانی سیگما استفاده شد. استانداردهای مذکور عبارت بودند از : Pteridin – 6 ، Isoxanthopteridin carboxylic acid، Biopteridin، Xanthopteridn.

تمام پتریدین های استاندارد مورد استفاده با توجه به وزن ملکولی و مولاریته با غلظت ۰/۰۰۱ مول در لیتر رقیق سازی شدند و سپس کروماتوگراف آنها جداگانه تهیه شد. .جهت استخراج پتردین از پشه های آنوفل استفنسی خون نخورده از روش پیشنهاد شده توسط (Lehane and WU 1999) . به شرح ذیل استفاده گردید. بافر مورد استفاده برای استخراج پتریدین شامل 0.1M NaOH و 0.15M Glycine محلول درآب مقطر بود که pH آن با استفاده از اسید استیک به ۷ تنظیم گردید. پشه ها بطور تصادفی به گروه های ده‌تایی تقسیم شدند و بر اساس سنین ۱ ،۵ ،۱۰، ۱۵ ، ۲۰ ، ۲۵ ، ۳۰ روزه و از هر سن هم جداگانه گروه های ده تایی بر اساس بافت مورد نظر برای استخراج پتردین از کپسول سر ، سینه و کل بدن آنوفل ماده خون نخورده دسته بندی شده و سر و یا سینه پشه ها بصورت جداگانه در ۱۰۰ میلی لیتر بافر و کل بدن هرده عدد آنوفل ماده نیزدر ۶۰۰ میلی لیتربافر هموژنیزه کننده قرار داده شد. در راستای استخراج پتردین از سر پشه ها، سر به همراه ضمائم پس از جداسازی، کاملاً با هموژنیز کننده دستی کل سر ها هموژنیزه گردید. برای آماده سازی قسمت سینه‌ها نیز بالها ، پاها و شکم زیر لوپ با استفاده از سوزن تشریح جدا و آماده هموژنیزه شدند. محصول بدست آمده از هموژنیزه نمونه های کل بدن، سر و سینه به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند که بعد از آن با استفاده از سرنگ استریل محلول های رویی برداشته و دو بار از فیلتر ۰/۲ میکرومتر گذرانده شد و در نهایت محصول حاصله در اپندورف دیگری تا زمان استفاده در دمای۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. کلیه مراحل هموژنیزه کردن نمونه ها در شرایط نور کم انجام شدند. جهت تهیه کروماتوگرام ۱۰ میکرولیتر از محصول استخراج شده با

استفاده از سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. سپس کروماتوگرام های بدست آمده بر اساس Retention time با کروماتوگرام های استاندارد مقایسه شد.

نتایج

در این مطالعه چهار نوع پتردین Isoxanthopteridin، Pteridin – 6 carboxylic acid، Biopteridin، Xanthopteridin در کوتیکول پشه های آنوفل استفنسی پیدا شد (نمودار ۱). همانطور که در این کروماتوگرام مشهود است بلند ترین کروماتوگرام متعلق Xanthopteridin است در حالی که در مقایسه با آن، Isoxanthopteridin درغلظت بسیار پایین مشاهد شد، ولی Rotation time آن در ۳/۲ تا ۳/۴ دقیقه پس از تزریق محلول به سیستم HPLC بود و پس از این زمان هیچ گونه پیکی در کروماتوگراف مشاهده نگردید. همچنین Rotation time برای Pteridin – 6 carboxylic acid و Biopteridin به ترتیب ۱/۶ . ۲/۲ دقیقه پس از تزریق به سیستم بود.

اگر چه این چهار نوع پتردین در کل جلد بدن پشه ها یافت شد ولی Isoxanthopteridin در سر و Xanthopteridn در سینه مشاهد نگردید (جدول ۱). میزان پتردین با افزایش سن پشه ها روند کاهنده ا ی را نشان داد بطوریکه این روند بصورت مشابه های پتردین های موجود در کل بدن ، سر و سینه دیده شد (نمودار ۲). همان طوری که در این نمودار مشهود است غلظت و به عبارتی تجمع پتردین به تناسب در سر بیشتر بود ولی شیب کاهش غلظت پتردین در سر مشابه کل بدن بود.

بحث

تعیین سن در حشرات ناقل اهمیت زیادی در برنامه ریزی های کنترل ناقلین و قطع انتقال بیماری های منتقله شونده توسط آنها دارد. اگرچه روش های متعددی برای تعیین سن ارائه شده است ولی هر کدام کارایی و محدودیت های خاص خود را بهمراه دارد. در پشه های ناقل، متداولترین روش برای تعیین سن، با روش تشریح تخمدان در پشه های ماده و بخصوص شمارش اتساع در تخمک های تخمدان است (Detinova 1962). در این روش در واقع با تعیین سن فیزیولوژیک پشه های ماده سن خطر ناک پشه ها برای انتقال انگل مالاریا تعیین می گردد که این شاخص در بررسی های مالاریومتریک بسیار مهم و استاندارد می باشد زیرا میزان آلودگی پشه ها به انگل پلاسمودیوم با خونخواری و متعاقباً چرخه گنوتروفیک ارتباط مستقیم دارد.

در این مطالعه غلظت چهار نوع پتردین مشاهده شده با افزایش روزانه طول عمر پشه ها، یک روند کاهنده را داشت. همچنین روند کاهش پتردین در کل بدن، و اعضای سر و سینه از یک تناسب برخوردار بود و تقریباً شیب همگنی در کاهش پتردین در تمام اعضای بدن مشاهده شد. این نتایج با آنچه که توسط Lehane and Wu در سال ۱۹۹۹ بر روی روند تغییرات پتردین در دو ناقل مهم مالاریا، آنوفل گامبیه و آنوفل استفنسی بیان شده مطابقت دارد.

در بین پتردین های موجود در ساختار کوتیکول حشرات، Biopteridin ، Pteridin – 6 carboxylic acid و Isoxanthopteridin در بسیاری از حشرات یافت گردیده است (Chefurka 1965). هر سه این مولکول ها در کوتیکول آنوفل گامبیه و آنوفل استفنسی پیدا شده است (Wu and Lehane 1999). در مطالعات قبلی نیز Biopteridin به میزان بسیار کم در *An. atroparus* و *An. labranchia* گزارش شده بود ولی در آن مطالعه از روش کروماتوگرافی استفاده گردید (Cerioni et al. 1975). مطالعات (Penilla et al. 2002) بر روی میزان پتردین در کوتیکول *An. albimanus* با استفاده از فلورسنت حاکی از آن است که این روش در تعیین سن بسیار بالا است زیرا آنها متوجه شدند که روش کروماتوگرافی تنها ۱ تا ۱۰ در صد پتردین موجود در کوتیکول را نشان می‌دهد. به هر حال با توجه به حساسیت و دقت نسبتاً خوب روش تعیین پتردین با آشکارساز فلورسانس می تواند سن پشه ها جمع-آوری شده از فیلد را نیز بخوبی تخمین زد.

میزان پتردین پشه ها اگر چه در اعضای مختلف بدن مانند سینه و سر متفاوت است اما آنالیز رگرسیون خطی نشان داد که با افزایش طول عمر پشه ها و کاهش پتردین در اعضای مختلف با یک شیب نسبتاً یکسان رخ می دهد و فقط ۱۶٪ تفاوت در روند نسبی کاهش پتردین در بین اعضای مورد بررسی مشاهد شد (Wall et al. 1991). این تناسب در کاهش پتردین در سر و سینه و کل بدن در مطالعه ما هم مشهود است و با روش های قبلی مشابهت دارد.

در این مطالعه از پشه های انسکتاریوم استفاده شد و که از شرایط محیطی نسبتاً یکسانی برخودار بودند در نتیجه غلظت پتردین تحت تاثیر عوامل محیطی مانند نور خورشید نبودند. ولی بر اساس مطالعات (Lardeux et al. 2000). ارتباط معنی داری بین غلظت پتردین در گونه‌های وحشی روز فعال مانند *Aedes polynesiensis* و گونه شب فعالی مانند *Culex quinquefasciatus* پیدا نشد. این نتایج حاکی از آنست که عوامل محیطی می‌توانند نقش مهمی در کاهش غلظت پتردین بخصوص در گونه‌های روز فعال داشته باشد. از اینرو مطالعه بر روی گونه‌های وحشی و شب فعالی *An. stephensi* در آینده بسیار ضروری است.

نتیجه گیری

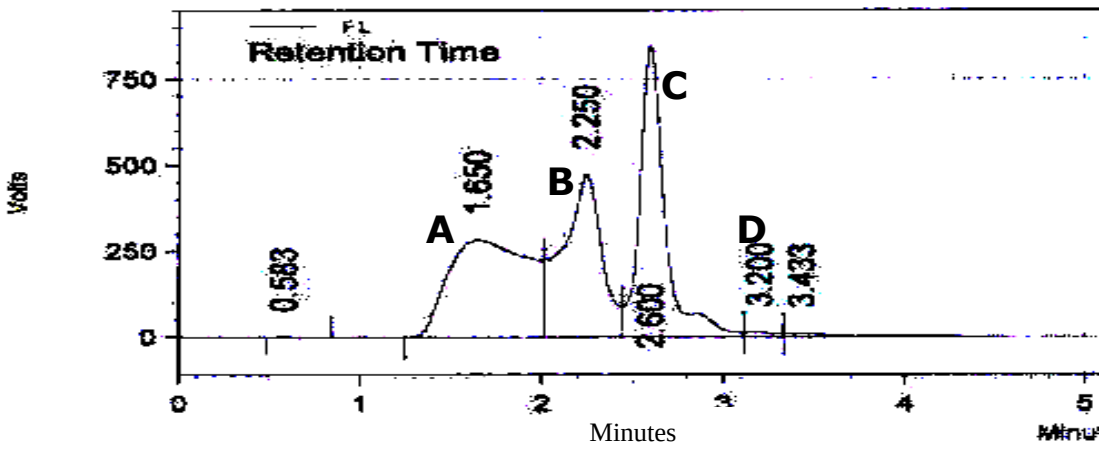
تعیین پتردین با کمک کروماتوگرافی مایع و آشکارساز فلورسانس ، روشی حساس و دقیق است و انواع ملکول های پتردین حتی در غلظت های پایین قابل تشخیص و تفکیک هستند. در این مطالعه چهار نوع ملکول پتردین در کوتیکول *An. stephesi* مشاهده شدند. ولی میزان و نوع آن ها در سر و سینه متفاوت بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه معکوس بین افزایش سن و کاهش پتردین در *An.stephesi* وجود دارد که این رابطه در تمام اعضای بدن و از جمله سر و سینه بطور همگنی مشاهده شد. لذا روش فلورسنتی کروماتوگرافی مایع مجهز به آشکارساز فلورسانس بعنوان یک روش دقیق در تعیین سن کرونولوژی پشه ها قابل استفاده است و استفاده از این روش برای تعیین سن پشه های فیلد مستلزم مطالعات بیشتر در گونه ها متفاوت دارد. زیرا نوع و غلظت پتردین بسته به گونه پشه، و رفتار آنها مانند شب و یا روز فعال بودن، متفاوت است.

جدول ۱- انواع ملکول های پتردین یافت شده در کوتیکول کل بدن، سر و سینه پشه آنوفل استفنسی

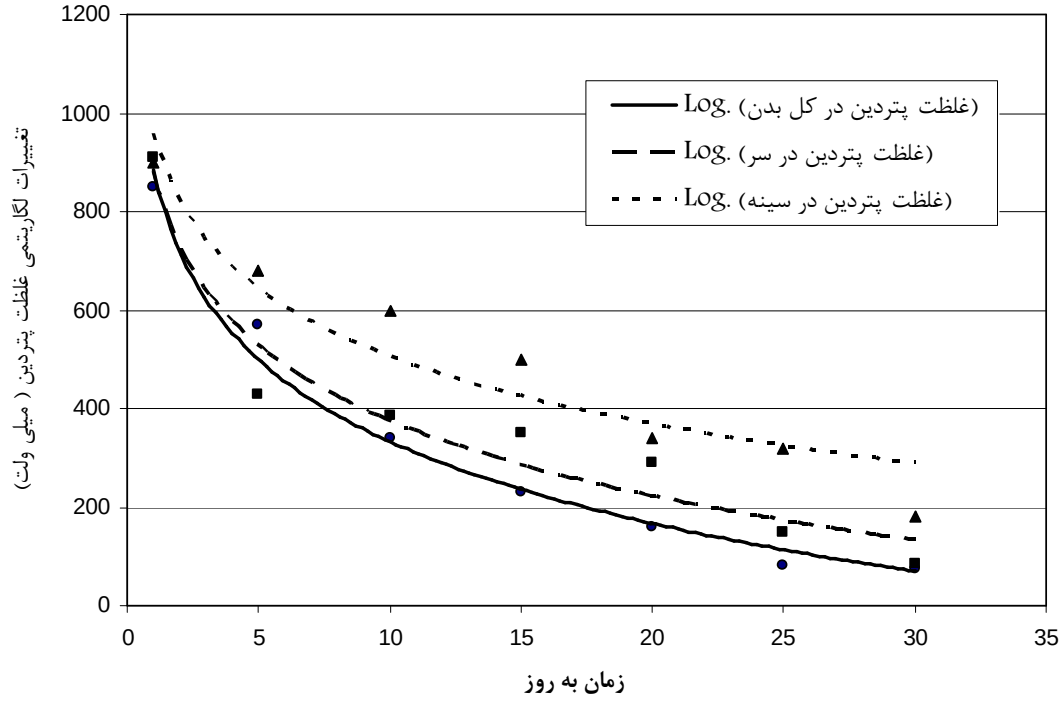
نوع پتردین / اندام استخراج	Biotridine	Xantopteridin	Pteridin-6-carboxilic acid	Isoxantopteridin
کل بدن	+	+	+	+
سر	+	+	+	-
سینه	+	-	+	+

+ : وجود پتردین در اندام تحت مطالعه

-: عدم وجود پتردین در اندام تحت مطالعه



نمودار ۱- کروماتوگرام پتردین های موجود در جلد آنوفل استفنسی ماده: A- Pteridin – 6 carboxylic acid، D- Isoxanthopteridin ،C- Xanthopteridn ،B- Biopteridin



نمودار ۲- مقایسه تغییرات غلظت پتردین استخراج شده ازکل بدن، سر و سینه پشه های ماده آنوفل استفنسی طی ۳۰ روز با پریود زمانی ۵ روزه ، سر و یا سینه پشه ها در گروه های ۱۰ تایی بصورت جداگانه در۱۰۰ ملی لیتر بافر و کل بدن هر ده عدد آنوفل ماده نیزدر۶۰۰ ملی لیتر بافر هموژنیزه کننده قرار داده شد و پس از هموژنیزه ، سانتریفیوژ و فیلتر شدن ، ۱۰ میکرو لیتر از هر محلول به سیستم HPLC تزریق شد.

References

Cerioni, E., Contini, C. and Laudani, U., 1975. Occurrence & distribution of known pterin in some species of Diptera. *Chemistry and biology of Pteridines* (ed. By W. Pfleiderer).

Chefuka, W., 1965. Metabolism of pterins. The parasitology of insecta, Vol. 2. *Academic Press, London*, pp.730-737.

Detinova, T.S., 1962. Age grouping methods in diptera of medical importance. W.H.O. *monograph series*. 47, 216 pp.

Fox, A.S. and Brust, R.A., 1994. How do dilations form in mosquito ovarioles. *Parasitology Today*. **10**(1): 19-23

Lardeux, F., Ung, A., and Chebret, M. 2000. Spectrofluorometers are not adequate for Aedes and Culex spp (Diptera: Culicidae) using pteridine fluorescence. *Journal of Medical Entomology*, **37**, pp. 769-773.

Mail, T.S. and Lehane, M.J., 1988. Characterization of pigments in the head capsule of the adult stablefly *Stomoxys calcitrans*. Entomologia experimentalis ET applicata, **46**, pp. 125-131.

Mail, T.S., Chadwick, J. and Lehane, M.J., 1983. Determining the age of adults of *Stomoxys calcitrans* L) (Diptera: Muscidae). Entomologia experimentalis Research. **73**, pp.501-525.

Millest. A.L., Cheke, R.A., Howe, M.A., Lehane, M.J. and Garms, R., 1992. Determining the age of adult females of different members of the *Simulium damnosum* cmplex (Diptera: simuliidae) by the pteridine accumulation method. *Bulletin of Entomological research*, **82**, pp.219-226.

Msangi, A. and Lehane, M.J., 1991. Amethod for determining the age of very young tsetse mosquitoes (Diptera: Glossinidae) and an investigation of the factors determinig head fluorescent levels in newly emerged adults. Bulletin of Entomological Research, **81**, pp.185-188.

Mullens, B.A. and Lehane, M.J., 1995. Pteridine fluorescence as a tool in age determination in Culicoides variipennis (Diptera:Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, **32**, pp.569-571.

Penilla, R.P., Rodiguez, M.H., Lopez, A.D., Viader-Salvado, J.M. and Sanches, C.N., 2002. Pteridine concentration differ between insectary-reared and field collected *Anopheles albimanus* mosquitoes of the same physiological age. *Journal of Medical Entomology*, **16,** pp. 225-234

Polovodova, V.P., 1949. Determination of the physiological age of female anopheles. Medical of parasitology (Moscow),**18**, pp. 352-355.

Wall, R., Langley, P.A. and Morgan, K.L. 1991. Age determination in the old-world screw worm fly Chrysomia bezziana by pteridine fluorescences. *Journal of Insect Physiology*, **36**, pp. 213-218.

Wu, D. and Lehane, M.J., 1999. Pteridine fluorescence for age determination of Anopheles mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, **13**, pp. 48-52.