

የፍሌቦቶሚን አሸዋ ትንኞችን ማቀነባበር እና ማንበር፡ የጋራ መግባቢያ መመሪያ

Fano José Randrianambintsoa¹, Laure Augendre¹, Jorian Prudhomme¹, Jean-Philippe Martinet¹, Mathieu Loyer¹, Nalia Mekarnia¹, Hocine Kerkoub¹, Farzana Khan Perveen¹, Antoine Huguenin^{1,2}, Emilie Kariya^{1,2}, Mohammad Akhoundi³, Andrey José de Andrade⁴, Eduardo Berriatua⁵, Gioia Bongiorno⁶, Sébastien Boyer^{7,8}, Vasiliki Christodoulou⁹, Magda Clara Vieira Da Costa-Ribeiro¹⁰, Lucas Alexandre Farias de Souza¹⁰, Huicong Ding¹¹, Blaise Dondji¹², Vít Dvořák¹³, Ozge Erisoz Kasap¹⁴, Eunice Aparecida Bianchi Galati¹⁵, Montserrat Gállego¹⁶, Cristina Ballart¹⁶, Stavroula Gouzou¹⁷, Nabil Haddad¹⁸, Rezki Sabrina Masse¹⁹, Asrat Hailu Mekuria²⁰, Vladimir Ivovic²¹, Szymon Kaczmarek²², Mohd Khadri Shahar¹⁹, Oscar D. Kirstein²³, Edwin Kniha²⁴, Iva Kolářová¹³, Lincoln Timinao²⁵, Cristian Lucanas²⁶, Ognyan Mikov²⁷, Kimsear Nov⁷, Yusuf Özbel²⁸, Bernard Pesson²⁹, Laura Cristina Posada Lopez³⁰, Didot Budi Prasetyo^{1,7}, Nil Rahola³¹, Eduardo A. Rebollar-Tellez³², Bruno Leite Rodrigues¹⁵, Lalita Roy³³, Prasanta Saini³⁴, Chizu Sanjoba³⁵, Paloma Helena Fernandes Shimabukuro³⁶, Padet Siriyasatien³⁷, Agnieszka Soszyńska²², Tatiana Suleşco³⁸, Massamba Sylla³⁹, Majhalia Torno⁴⁰, Petr Volf¹³, Khamsing Vongphayloth⁴¹, Vu Sinh Nam⁴², April Wardhana⁴³, Eric Yessinou⁴⁴, Sonia Zapata⁴⁵, Jean-Charles Gantier¹, and Jérôme Depaquit^{1,2,*} 

¹ Faculté de Pharmacie, Université de Reims Champagne Ardenne, UR ESCAPE-USC ANSES PETARD, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

² Pôle de Biologie territoriale, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalo-Universitaire, 51092 Reims, France

³ Parasitology-Mycology Department, Avicenne Hospital, AP-HP, Bobigny, Sorbonne Paris Nord University, France; Unité des Virus Émergents (UVE: Aix-Marseille Univ, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), 13005 Marseille, France

⁴ Parasitology Collection of Basic Pathology, Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba 19031, Brazil

⁵ Department of Animal Health, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

⁶ Department of Infectious Diseases, Vector-borne Diseases Unit, Istituto Superiore di Sanità, 00166 Rome, Italy

⁷ Medical and Veterinary Entomology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh 12201, Cambodia

⁸ Ecology & Emergence of Arthropod-borne Pathogens Unit, Department of Global Health, Institut Pasteur, CNRS UMR2000, 75015 Paris, France

⁹ Section Veterinary Services (1417), Laboratory for Animal Health Virology, Aglantzia, Nicosia 2109, Cyprus

¹⁰ Insects Vectors and Parasites Laboratory, Department of Basic Pathology and Postgraduate program in Microbiology, Parasitology and Pathology, Federal University of Paraná, 81530-900 Curitiba, Brazil

¹¹ Department of Biological Sciences, National University of Singapore, 117558, Singapore

¹² Laboratory of the Leishmaniasis Research Project, Mokolo District Hospital, Mokolo, Cameroon; Laboratory of Cellular Immunology and Parasitology, Department of Biological Sciences, Central Washington University, 98926 Ellensburg, WA, USA

¹³ Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, 12800 Prague, Czechia

¹⁴ VERG Laboratories, Department of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University, Beytepe, Ankara 06800, Türkiye

¹⁵ Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (FSP/USP), Pós-graduação em Saúde Pública, 01246-904 São Paulo, Brazil

¹⁶ Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona, & Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal), Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), 08028 Barcelona, Spain

¹⁷ Laboratory of Infectious Diseases and Public Health, School of Medicine, University of Cyprus, Nicosia, Cyprus & Department of Pediatrics, Archbishop Makarios III Hospital, Nicosia 2115, Cyprus

¹⁸ Faculty of Health Sciences, American University of Beirut, 1107 2020 Beirut, Lebanon

¹⁹ Medical Entomology Unit, Infectious Disease Research Centre, Institute for Medical Research (IMR), National Institutes of Health (NIH), Ministry of Health Malaysia, 40170 Shah Alam, Selangor, Malaysia

²⁰ School of Medicine, Addis Ababa University, 28017 - 1000 Addis Ababa, Ethiopia

²¹ Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies, University of Primorska, 6000 Koper, Slovenia

Edited by Jean-Lou Justine

*Corresponding author: jerome.depaquit@univ-reims.fr

²² University of Lodz, Faculty of Biology and Environmental Protection, Department of Invertebrate Zoology and Hydrobiology, Banacha 12/16, 90-237 Łódź, Poland

²³ Laboratory of Entomology, Ministry of Health, 9134302 Jerusalem, Israel

²⁴ Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Institute of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Medical University Vienna, Kinderspitalgasse 15, 1090 Vienna, Austria

²⁵ Papua New Guinea Institute of Medical Research (PNGIMR) Institute, PO Box 60, Headquarter, Homate Street, 441 Goroka, Eastern Highlands Province, Papua New Guinea

²⁶ Museum of Natural History, University of the Philippines Los Baños, 4031 Laguna, Philippines

²⁷ National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504 Sofia, Bulgaria

²⁸ Ege University, Faculty of Medicine, Department of Parasitology, 35040 Bornova/Izmir, Türkiye

²⁹ Retired, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

³⁰ Program for the Study and Control of Tropical Diseases (PECET), Faculty of Medicine, University of Antioquia, 050010 Medellin, Colombia

³¹ MIVEGEC, Univ. Montpellier, CNRS, IRD, 34394 Montpellier, France & Medical Entomology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, 101 Antananarivo, Madagascar

³² Laboratorio de Entomología Médica, Departamento de Zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, 66455, NL, México

³³ Tropical and Infectious Disease Centre, BP Koirala Institute of Health Sciences, Dharan 56700, Nepal

³⁴ ICMR-Vector Control Research Centre, Pudukcherry 605006, India

³⁵ Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

³⁶ Grupo de estudos em Leishmanioses/Coleção de Flebotomíneos (COLFLEB/Fiocruz-MG), Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30190009, Brazil

³⁷ Center of Excellence in Vector Biology and Vector-Borne Disease, Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³⁸ Department of Arbovirology, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Bernhard Nocht Str. 74, 20359 Hamburg, Germany ³⁹ Laboratory Vectors & Parasites, Department of Livestock Sciences and Techniques, Sine Saloum University El Hadji Ibrahima Niass (SSUEIN) Kaffrine Campus, C.P. 24600, Senegal.

⁴⁰ Environmental Health Institute, National Environment Agency, Singapore 138667, Singapore & Department of Biological Sciences, National University of Singapore, 117558 Singapore

⁴¹ Institut Pasteur du Laos, Laboratory of Vector-Borne Diseases, Samsenhai Road, Ban Kao-Gnot, Sisattanak District, 3560 Vientiane, Lao PDR

⁴² National Institute of Hygiene and Epidemiology, 1 Yec-Xanh Street, Hai Ba Trung District, 100000 Hanoi, Vietnam

⁴³ Indonesian Research Center for Veterinary Science, Indonesian Agency for Agricultural Research and Development, Ministry of Agriculture Republic Indonesia, Bogor 16114, Indonesia & Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University, Surabaya 60115, Indonesia

⁴⁴ Laboratory of Research in Applied Biology, Polytechnic School of Abomey-Calavi, University of Abomey-Calavi, 01 P.O. Box 2009, 00000 Cotonou, Benin

⁴⁵ Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA), Universidad San Francisco de Quito (USFQ), 170901 Quito, Ecuador

Received 1 December 2025, Accepted 29 January 2026, Published online 3 April 2026

አጭር ማጠቃለያ (Abstract)

ይህ ጽሑፍ የአሸዋ ትንሻ ናሙናዎችን ለማቀነባበር እና በስላይድ ላይ ለማንበር የሚያገለግል አጠቃላይ መመሪያ ያቀርባል፤ ይህም ለዝርያ መለያ እንዲሁም በሽታ አምጪ ተህዋስያንን ለመለየት እና ለይቶ ለማውጣት እጅግ አስፈላጊ ነው። ጽሁፉ ለመስክም ሆነ ለቤተ-ሙከራ ሁኔታዎች ተስማሚ የሆኑ የተለያዩ ዘዴዎችን ይተነትናል። ይህ መመሪያ ስለ አሸዋ ትንሻዎች አሰባሰብ፣ አያያዝ እና በማድንዘዝ የመግደል ሂደት (ከኪሚካሎች ይልቅ በቅዝቃዜ ማድረቅ ወይም በካርቦን ዳይ ኦክሳይድ (CO2) እንዲገደሉ ተመራጭ ዘዴዬ መሆኑን ያስገነዝባል) እንዲሁም የአሸዋ ትንሻ ናሙናዎችን ለረጅም ጊዜ ለማቆየት በቅዝቃዜ ወይም በኢታናል ውስጥ ስለማቆየት ያሉ ስልቶችን ዝርዝር መመሪያዎችን ያካትታል።

የአሸዋ ትንሻ የአካል ክፍሎች (የመራቢያ አካላት፣ ጭንቅላት እና ክንፎች) የዝግጅት ጥራት ለማይክሮስኮፕ ምልክታ አስፈላጊ በመሆኑ በዚህ ሥራ ውስጥ ተገልጿል። ጽሁፉ የናሙና ማቀነባበሪያ ሂደቶችን በዝርዝር ይገልጻል። ለምሳሌም እንደ ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ እና የማርክ-አንድሬ (Marc-André) ዉህዶችን በመጠቀም ናሙናዎችን የማጥራት ሂደትን (clearing process) ያካትታል። የአሸዋ ትንሻ ናሙና ማንበር ሂደቱ የተለያዩ ዘዴዎችን የሚያወዳድር ሲሆን፣ የአካሉንም ሲራዊ ባህሪያት (optical properties) እና የማቆየት አቅም (preservation potential) ላይ ትኩረት ያደርጋል። የሆየር ፈሳሽ (Hoyer fluid - chloral gum) ወይም ከሎራል ገም ተብሎም የሚታወቀው የሴት የዘር ከረጢትን (spermathecae) በግልጽ ለማየት እና ለፈጣን ምልክታ ተመራጭ ሆኖ ሳለ ለረጅም ጊዜ ማቆያ ግን ተስማሚ አይደለም።

በተጨማሪም ሌሎች የተጠቀሱ ወይም እንደ ፖሊቪኒል አልኮል (polyvinyl alcohol)፣ ዩፓራል ([Euparal®] - ውስን ውሃን የመቋቋም አቅም ላላቸው) እና ካናዳ ባልሳም ([Canada balsam] - በሃይድሮካርቦን የሚሟሟ) ሲሆኑ፣ የኋለኛቹ ሁለቱ ናሙናን ለረጅም ጊዜ የማቆየት አቅም አላቸው። እንዲሁም የናሙና አቀነባበር ልዩ ትኩረት የሚሹ አዳዲስ የሞለኩሎች ባዮሎጂ ዘዴዎች ለምሳሌ የዘረ መል ኮድ ቅደም ተከተል ትንተና (DNA sequencing) እና ማልዲ ቶፍ (MALDI-ToF) ተዳስሰዋል። በተጨማሪም፣ የተለያዩ የናሙና ዝግጅት ዘዴዎችን የሚያሳዩ አጫጭር የቪዲዮ ይዘቶች እና የፅሁፍ መመሪያው በ33 የተለያዩ ቋንቋዎች ተተርጉመው የቀረቡ ሲሆን፣ ይህም መመሪያው የአለም አቀፉን የሳይንስ ማህበረሰብ ፍላጎት እንዲያሟላ ያስችለዋል።

ቁልፍ ቃላት (Key words): ማንበር (Mounting)፣ ፍሌቦቶሚስ የአሸዋ ትንኝ (phlebotomine sand fly)፣ የሆየር ፈሳሽ (Hoyer fluid)፣ የማርክ-አንድሪ ወይም (Marc-André solution)፣ ክሎራል ገም (chloral gum)፣ ፖሊቪኒል አልኮል (polyvinyl alcohol)፣ ዩፓራል (Euparal®)፣ ካናዳ ባልሳም (Canada balsam)፣ የሌሽማኒያ ንጠላ (Leishmania isolation)፣ የመስክ ሁኔታዎች (field conditions)፣ ማራባት (culture)፣ መበለት (dissection)፣ ሞለኩሎች ባዮሎጂ (molecular biology)፣ ማልዲ ቶፍ (MALDI-ToF)፣ ሙነት-አምሳያ (Type-specimens)።

Abstract – Processing and mounting phlebotomine sand flies: a consensus guideline. This article provides a comprehensive guide for the processing and mounting of phlebotomine sand fly specimens, which is crucial for species identification and pathogen detection and isolation. It discusses a range of techniques suitable for both field and laboratory settings. The guide includes detailed instructions on sand fly collection, handling, covering, and euthanasia (recommending dry freezing or CO₂ over chemicals) as well as conservation strategies, such as cold storage and preservation in ethanol. The quality of preparation of certain anatomical structures (genital organs, head and wings) is essential for their proper microscopic observation and is described in this work. The article also presents detailed sample processing, including the clearing process with agents such as potassium hydroxide then Marc-André solution. The mounting process compares different media, emphasizing their optical properties and preservation potential. Hoyer fluid (also known as chloral gum) is recommended for quick observation, particularly for spermathecae, due to its clarity, although it is not suitable for long-term storage. Other media discussed include polyvinyl alcohol, Euparal® (for limited water tolerance), and Canada balsam (a hydrocarbon-soluble medium), with the latter two offering long-term preservation capabilities. Innovative molecular biology approaches such as DNA sequencing and MALDI-ToF, which require particular attention to sample processing, are also addressed. Furthermore, short video clips illustrating various mounting techniques as well as translations in many different languages are provided, allowing the guideline to reach the diverse needs and expectations of the global scientific community.

Key words: Mounting, Phlebotomine sand fly, Hoyer fluid, Marc-André solution, Chloral gum, Polyvinyl alcohol, Euparal®, Canada balsam, *Leishmania* isolation, Field conditions, Culture, Dissection, Molecular biology, MALDI-ToF, Type-specimens.

መግቢያ (Introduction)

ፍሌቦቶሚን አሸዋ ትንኞች (Phlebotomine sand flies) ሳይኮዲዴ (Psychodidae) በተባለው የንፍሳት ቤተሰብ እና ፍሌቦቶሚኒ (Phlebotominae) በተባለው ንዑስ ቤተሰብ ውስጥ የሚመደቡ ሆኖ ቢያንስ 1,063 የታወቁ ዝርያዎች ያሏቸው ትናንሽ ባለ ሁለት ክንፍ (dipteran) ነፍሳት ናቸው [21]። እነዚህ ትንኞች ለላይሽማኒያሲስ (leishmaniasis - ቁስለ-ደቄ)፣ ለአርባካይረስ ኢንፌክሽኖች እና ለባርቶኔሎሲስ (bartonellosis) በሽታዎች ተጠያቂ የሆኑ በሽታ አምጪ ተህዋሶችን (ላይሽማኒያ፣ አርባካይረስ እና ባርቶኔላ) የሚያስተላልፉ ተባቦች (vectors) ናቸው። የእነዚህን ትንኞች ዝርያ የመለየት ዘዴዎች በጥንቃቄ ናሙናን በመሰብሰብና በመያዝ እንዲሁም በሰላይድ ላይ በማንበር፣ ከዚያም በአገላ መነጻር (Microscopic) ምርመራ የሚከናወን ነው። ይህ ሂደት በርካታ ቴክኒኮችን የሚጠይቅ ሲሆን፣ እያንዳንዱ ቴክኒክ የራሱ ጥቅሞች እና ገደቦች ወይም ጉድለቶች አሉት።

የአሸዋ ትንኞች መለያ ዘዴ በውጫዊ የአካል ክፍሎች (ለምሳሌ፡- አንቴና፣ ፓልፒ፣ የወንድ መራቢያ አካል) እና በውስጣዊ የአካል ክፍሎች

(ለምሳሌ፡- ጉርር [pharynx]፣ የምግብ መፍጫና ማስተላለፊያ ቧንቧ [cibarium] እና የሴት የዘር ከረጢት [spermathecae]) ምልክታ ላይ የተመሰረተ ነው። የውስጣዊ ክፍሎቹን መበለት እና ንጠላ ምልክታውን በማቅለል ትክክለኛ ዝርያ መለየትን ያስችላል። ስለዚህ፣ ከወባ ትንኝና ሌሎች ተባቦች ለምሳሌ ትኋን መሰል ተባይ (kissing bugs) በተለየ ሁኔታ፣ አሸዋ ትንኞችን በዝርያ ለመለየት ናሙናዎችን በሰላይድ እና በሽፋን መስታወት (cover slip) መካከል ማንበር ያስፈልጋል።

እስከ 1980ዎቹ ድረስ የአገላ መነጻር ምልክታ አሸዋ ትንኞችን መለያ ብቸኛ ዘዴ ነበር፤ እስካሁንም ድረስ በስፋት ጥቅም ላይ እየዋለ ይገኛል። ስለዚህ የሂደቱ እና የዝግጅቱ ምርጫ በአንጻራዊ ሁኔታ ግልጽ እና በሁለት አማራጮች ላይ የተመሰረተ ነው። የመጀመሪያው ዘይቤ ናሙናው ለረጅም ጊዜ እንዲቆይ የሚያስችል ቋሚ ማንበር (definitive mounting) ሲሆን፣ ሁለተኛው ደግሞ ናሙናን ለረጅም ጊዜ ለማቆየት ዋስትና በማይሰጥ ፈሳሽ ውስጥ በፍጥነት ማንበር ናቸው። ለምሳሌ ናሙናን በቋሚነት ለማንበር እንደ ካናዳ ባልሳም (Canada balsam) ባለ ሙጫዎች ውስጥ ማንበር፣ ናሙናው ሙሉ በሙሉ ለመድረቅ ብዙ ጊዜ የሚወስድ ነው። በተጨማሪም፣ የዚህ

ወይንም የብርሃን ነጻብራቅ አመልካች መለኪያ (refractive index) የሴት ትንኝ የዘር ከረጢት (spermathecae) በቀላሉ ለማየት አያስችልም። በተቃራኒው በውሃማ ወይንም (ለምሳሌ፡- በሆየር ፈሳሽ [Hoyer fluid]) ማንበር ፈጣን እና የሴት ትንኝ የዘር ከረጢት በግልጽ ለማየት ይረዳል፤ ነገር ግን ወይንም ውሃን ከአየር የመሳብ ባህሪ ስላለው ለረጅም ጊዜ ማቆያ ተስማሚ አይደለም። ይህን ችግር ለመቅረፍ አንደኛው አማራጭ ስላይዱ ሙሉ በሙሉ ሲደርቅ ጠርዘን በጥፍር ቀለም ማሸግ (seal) ነው። ይህ የጥቅምና ጉዳት ሚዛን (ምርጫ) እንደ ናሙናው ዝግጅት ዓላማ፣ የምንመርጠው ናሙናን የማንበር ዘዴ (Mounting method) ላይ ተጽዕኖ ያሳድራል።

ከ 1980ዎቹ ጀምሮ የአሸዋ ትንኝ መለያ ጥናቶች የአካላዊ ቅርጽ (morphology) እና የባዮ-ኬሚካል ዘዴዎችን አቀናጅተዋል። የመጀመሪያው የትንኝ ቆዳ ሽፋን የሃይድሮካርቦን ትንተና (cuticular hydrocarbon analyses) ሲሆን፣ በፍጥነትም በሞለኪውላር ባዮሎጂ ቴክኒኮች (ለምሳሌ፡- በዘፈቀደ የሚባዙ ብዙ-መልክ የዲኤንኤ ክፍሎች [Random amplified polymorphic DNA]- RAPD, በቆራጭ ኢንዛይሞች የሚፈጠር የዲኤንኤ ቁርጥራጭ ርዝመት ልዩነት [restriction fragment length polymorphism]-RFLP, ዲኤንኤ ማባዛት እና የሳንገር የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል፣ እንዲሁም የቀጣዩ ትውልድ (Next Generation) የዘረ መል ኮድ የቅደም-ተከተል ትንተና) ተተክቷል። ከቅርብ ጊዜ ወዲህም የሞለኪውላር ዘዴዎች በጥርቲን ምርመራ ዘዴዎች ለምሳሌ ማልዲ-ቶፍን (MALDI-ToF) በመሳሰሉ ተጠናክረዋል። ከዚህም በተጨማሪ፣ የዘረ-መል (Molecular) ዝርያ መለያ ዘዴን በሽታ አምጪ ተህዋሲያንን በፔሲኦር (PCR) ከመለየት ተግባር ጋር ማቀናጀት ይቻላል። ይህም አንድ ሊሽማሌ (Leishmania)፣ ትራይፓሶሶማ (Trypanosoma)፣ ባርቶኔላ (Bartonella) እና ፍሌቫቪሪስ (Phlebovirus) ያሉ ተህዋሲያንን በሁለቱም የፔሲኦር (PCR) ዓይነቶች ማለትም፣ ኤንድ ስፔንት [End-point] እና ሪል ታይም [Real-time] መለየት ስለሚቻል ነው። ሆኖም ይህ ሂደት ናሙና አሰባሰብ እና አያያዝ (Storage) ከተቀመጠው ዓላማ ጋር እንዲጣጣም ማስተካከልን ይጠይቃል። ዝርያዎችን ለመለየት በልምድ ከምንጠቀምባቸው አካላዊ መዋቅሮች (Morphological characteristics) በተጨማሪ፣ ሌሎች አካላዊ ዘዴዎችንም (ለምሳሌ የክንፍ ጂኦሞርፎሚትሪ/Wing geomorphometry) ተግባራዊ ማድረግ ይቻላል። ይህ ደግሞ እንደታወቀው ግብ የናሙና አሰባሰብ እና አያያዝ ሂደትን ማስተካከል ይጠይቃል [3, 32]። ከባህላዊ የአካላዊ ቅርፅ ባህሪያት በተጨማሪ፣ ሌሎች የአካላዊ ቅርፅ ዘዴዎችም (ለምሳሌ፡- የክንፍ ጂኦሞርፎሚትሪ) ጥቅም ላይ ሊውሉ ይችላሉ።

የጽሁፉ ባለቤቶችን (Authors) የግል ተሞክሮ እና በቀድሞ የምርምር ጽሑፍ መረጃዎች ላይ በመመስረት፣ የዚህ ጥናት ዓላማ አሸዋ ትንኝን ለአካላዊ ቅርጽ እና ለሞለኪውላዊ ምርመራዎች አመቺ በሆነ መልኩ ለማንበር እና ለማዘጋጀት የሚያስችል ደረጃውን የጠበቀ መመሪያ (standardized guidelines) ማቅረብ ነው። የተወሰኑ ትንተናዎችን (ለምሳሌ፡- ሞለኪውላር ባዮሎጂ ወይም ማልዲ-ቶፍ [MALDI-ToF]) ለማከናወን፣ ለአካላዊ ቅርፅ (Morphological) መለያ የሚያፈለጉትን የአሸዋ ትንኝ አካል ክፍሎች ጠብቆ ማቆየትን ይጠይቃል። ይህም እጅግ ጥንቃቄ የተሞላበት የምርምር ቅደም ተከተል (Protocol) ምርጫ አስፈላጊ መሆኑን ያሳያል። በዚህ ጽሑፍ ውስጥ፣ በሕይወት የተያዙ የአሸዋ ትንኝን ማደንዘብ (Anesthesia) እና በስቃይ አልባ መግደያ (Euthanasia) ዘዴዎች፣ ክምችታቸውን (Storage) እና ለፈጣን መለያ ወይም ለረጅም ጊዜ ማቆያ (ለቀጣይ ጥናቶች እንዲመች) የሚረዳውን የማንበር (Mounting) ሂደት ላይ ትኩረት እናደርጋለን።

1. የአሸዋ ትንኝ አሰባሰብ (Sand fly capture)

የአሸዋ ትንኝን በተለያዩ ዘዴዎች በመጠቀም በሕይወት አያሉ ወይም ከሞቱ በኋላ መሰብሰብ ይቻላል። እነዚህም ዘዴዎች እንደ ሲዲሲ የብርሃን

ወጥመዶች (CDC miniature light traps)፣ የሚያጣብቁ ወጥመዶች (sticky traps)፣ ሻኖን የሚባል ወጥመዶችን (Shannon traps) በመጠቀም። ወይም በቀጥታ በአካባቢው ካሉ ማረፊያ ቦታዎቻቸው (ለምሳሌ፡- ከእንስሳት መጠለያዎች) በመጣጭ መሣሪያዎች (aspirators) በመሳብ መሰብሰብን ያካትታሉ። እነዚህ ዘዴዎች ወጥመዶችን ተስማሚ በሆኑ የመኖሪያ አካባቢዎች ውስጥ ማስቀመጥን፣ ትንኞቹን በብርሃን ወይም በሌሎች ማማለያዎች (ለምሳሌ፡- ካርቦን ዳይኦክሳይድ (CO2) ወይም ኬሚካላዊ ማማለያዎች) መሳብን፣ እና ለቀጣይ ምርመራ መሰብሰብን ያካትታሉ። ይህም በተለያዩ የሳይንስ ጽሑፎች ላይ ተገልጿል [2, 3, 32, 36, 49]።

አሸዋ ትንኞችን በሕይወት አያሉ መሰብሰብ ሁሉንም የቀጣይ የላቦራቶሪ ምርመራዎችን ለማካሄድ ያስችላል፤ በአንጻሩ የሞቱ ትንኞችን መሰብሰብ ግን የላይሽማሌ ጥገኛ ተህዋሲያንን ወይም የቫይረስ ዝርያዎችን ለመለየት (isolation) አስቸጋሪ ያደርገዋል። አንዳንድ የመሰብሰቢያ ዘዴዎች፣ ለምሳሌ የሚያጣብቁ ወረቀቶች (sticky papers)፣ የአሸዋ ትንኝ የአካል ክፍሎችን (አንቴና፣ ፓልፒ፣ ክንፎች ወይም አግሮች) እንዲረግፉ ወይም እንዲጠፉ ያደርጋሉ። በሚያጣብቁ ወረቀቶች ላይ የሚቀጣው የጉሎ ዘይት (castor oil) ትንኞቹን ስለሚያጣብቅ፣ አስቀድሞ መወገድ አለበት፤ ይህም የሚከናወነው እኩል መጠን ባለው የኤታር እና ዳይኤትል ኢተር (diethyl ether) በእኩል መጠን በማደባለቅ ለ 15 ደቂቃ በመዘፍዘፍ ነው።

2. ስቃይ አልባ የናሙናዎች አገዳደል (Specimen euthanasia)

አሸዋ ትንኞች ከተሰበሰቡ በኋላ በሕይወት ካሉ መገደል አለባቸው። በአንዳንድ የአሰባሰብ ዘዴዎች (ለምሳሌ፡- አጣባቂ ወረቀቶች፣ በሳሙና ወይም በአልኮል የተሞላ ማጠራቀሚያ ያላቸው የሲዲሲ (CDC) የብርሃን ወጥመዶች) ትንኞቹ በሚያዙበት ጊዜ ወዲያው ይሞታሉ። በቀጥታ በአልኮል (Ethanol) ውስጥ ለተሰበሰቡ ወይም ከተያዙ በኋላ በአፋጣኝ አልኮል ውስጥ ለገቡ ትንኞች የዘረ-መል (Molecular biology) ምርመራ ማድረግ ይቻላል። ሆኖም፣ እነዚህ የመግደያ ዘዴዎች ናሙናውን በማልዲ-ቶፍ (MALDI-ToF) ለመመርምር አያስችሉም። በተጨማሪም፣ አንዳንድ የመግደያ ዘዴዎች የተወሰኑ አካላዊ መለያዎችን (Morphological characters) ሊያጠፉ ይችላሉ። ስለዚህ ትክክለኛውን ዝርያ ለመለየት ወይም ናሙናዎችን ለረጅም ጊዜ እንደ ማስረጃ (Voucher specimens) ለማስቀመጥ ተገቢውን የመግደያ ዘዴ መጠቀም ወሳኝ ነው።

ኢታይል አሲቴት (Ethyl acetate)፣ ኢታይል ኢተር (Ethyl ether)፣ ቴትራክሎሮኤቲን (Tetrachloroethane) እና ክሎሮፎርም (Chloroform) የመሳሰሉ ኬሚካሎችን በጥጥ ነክሮ ትንኞቹ ባሉበት ዕቃ ውስጥ በማስቀመጥ መግደል ይቻላል። እነዚህ ኬሚካሎች መርዛማ በመሆናቸው በአምራቹ መመሪያ መሠረት በጥንቃቄ መያዝ አለባቸው። ይሁን እንጂ፣ በእኛ ተሞክሮ ክሎሮፎርምን መጠቀም ለዘረ-መል (Molecular) ጥናቶች አመቺ ስላልሆነ ትንኞችን በዚህ ኬሚካል መግደልን አንመክርም። ባጠቃላይ እነዚህ ኬሚካሎች አደገኛ በመሆናቸውና ለዘረ-መል ትንተና ያላቸው ብቃት አጠራጣሪ በመሆኑ፣ ጥቅም ላይ ባይውሉ ይመረጣል።

አካላዊ ቅርፅ (Morphology)፣ ዲ ኤን ኤን (DNA) ወይም ፕሮቲንን ሳይበላሽ ለመጠበቅ በብዛት ጥቅም ላይ የሚውለው ዘዴ ናሙናዎችን በደረቁ ማቀዝቀዝ (Dry freezing) ነው። ትንኞቹ ሙሉ በሙሉ እንዲደንዘዙ (Anesthetized) ለተወሰነ ጊዜ ማቀዝቀዥ ወስጥ መቆየት አለባቸው፤ ነገር ግን እንዳይደርቁ ወይም ዓላማው የሊሽማሌ ጥገኛ ተህዋሲያንን ከትንኛ ሆድ ውስጥ ለይቶ ማሳደግ (Culture) ከሆነ የተህዋሲያኑን ሕልውና እንዳይጎዳ ጥንቃቄ መደረግ አለበት። ስለዚህ የሊሽማሌ ተህዋሲያን እንዳይሞቱ ከትትል በማድረግ ናሙናውን በ -20 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ቅዝቃዜ ውስጥ ከ15 እስከ 20 ደቂቃዎች እንዲቆዩ ማድረግ ይመከራል።

ማቀዝቀዣ (Freezer) በማይኖርበት ጊዜ ትንኞችን በካርቦን ዳይኦክሳይድ (CO₂) መግደል ይቻላል። የCO₂ ሲሊንደሮችን ወደ መስክ መውሰድ በማይቻልበት ሁኔታ፣ ለመጠጥ ማከፋፈያ (Soda siphons) የሚያገለግሉ ትናንሽ የካርቦን ዳይኦክሳይድ መያዣዎችን መጠቀም ይቻላል። ነገር ግን እነዚህን በአውሮፕላን ለማንጓዝ ገደብ ሊኖር ይችላል። እንደ መጨረሻ አማራጭ፣ ትንኞችን በሲጋራ ጭስ መግደል ይቻላል። በሲ.ዲ.ሲ (CDC) ወጥመድ የተያዙ ትንኞች በመምጠጫ (Aspirator) ተስበው በመስታወት ቱቦ ውስጥ እንዲቆዩ ከተደረገ በኋላ ለሲጋራ ጭስ ሲጋለጡ በስክንዶች ውስጥ ይሞታሉ። ይህ ዘዴ በማንኛውም የመስክ ሁኔታ እና ራቅ ያሉ አካባቢዎችም ጭምር ተግባራዊ ሊሆን ይችላል። ሆኖም፣ የመስታወቱ ቱቦ በጭስ ስለሚበከል፣ በደንብ ሳይጸዳ በሕይወት ያሉ ትንኞችን ለመያዝ ዳግመኛ መጠቀም አይቻልም። ቢሆንም፣ ያልጸዳውን መምጠጫ ለሌሎች ትንኞች መግደያነት መጠቀም ይቻላል። ሁሉም ናሙናዎች ከመምጠጫው ውስጥ መውጣታቸውን ማረጋገጥ ያስፈልጋል። እነዚህ ሁሉ ዘዴዎች የትንኛን ሆድ በመበለት (Gut dissection) የሊሸማኒያ ተህዋሲያንን ለይቶ ለማውጣት ምቹ ናቸው።

መቅደም (Preface):-

የደህንነት እና የቁጥጥር ጉዳዮች ተገቢውን የቁስ ደህንነት መረጃ ሰነድ (Safety Data Sheets - SDS) መጥቀስ አለባቸው። በዚህ መመሪያ ውስጥ የቀረቡ ሁሉም ኬሚካሎች ጥብቅ በሆነ የደህንነት ሁኔታ ውስጥ መያዝ ይኖርባቸዋል። ስለዚህ ኬሚካሎች አደገኛነት እንዲሁም ስለ አያያዛቸው እና ስለ አወጋገባቸው መረጃ የሚሰጡ የምርምር ተቋማት የጤና እና ደህንነት ኮሚቴዎች አሉ። ኬሚካሎቹን ስለመጠቀም ስለማስወገድ የቀረቡትን የደህንነት መመሪያዎች መከተል ግዴታ ነው። በተጨማሪም፣ መልካም እና ደህንነቱ የተጠበቀ የላቦራቶሪ አሰራርን መከተል እንዲሁም የሀገሪቱን ወይም የምርምር ተቋሙን ሕጎች እና ደንቦች ማክበር የእያንዳንዱ ተጠቃሚ ኃላፊነት መሆኑ ሊታወቅ ይገባል። ከዚህም በላይ፣ የተወሰኑ ኬሚካሎች ወይም የኬሚካሎቹ ክፍሎች (ለምሳሌ፡- ክሎራል ሃይድሬት/Chloral hydrate) በአንዳንድ ሀገራት በሕግ የተገደቡ ሊሆኑ ይችላሉ። በዚህ ጽሑፍ ውስጥ ጥቅም ላይ የዋሉ ምህጻረ ቃላት ዝርዝር በስንጠረዥ 1 ላይ ቀርቧል።

ስንጠረዥ ቁጥር 1 የምህጻረ ቃላት ዝርዝር (List of abbreviations)

DNA [ዲ.ኤን.ኤ]	Deoxyribonucleic acid = የዘረመል መረጃ ተሸካሚ ሞለኪዌል
RNA [አር ኤን ኤ]	Ribonucleic acid = አርኤንኤ የተባለ የዘረመል መረጃን አስተላላፊ ሞለኪዌል
BME [ቢ.ኤም.ኢ.]	Basal Medium Eagle = ለህዋሰ ማራቢያ የሚያገለግል ፈሳሽ ዉህድ
CDC [ሲ.ዲ.ሲ.]	Centers for Disease Control and Prevention = የበሽታ መቆጣጠሪያና መከላከያ ማዕከል
CMCP [ሲ.ኤም.ሲ.ፒ.]	Camphor-monochlorophenol ካምፎር-ሞኖክሎሮፌኖል የሚባል ናሙና ማንበሪያ ኬሚካል
CMR [ሲ.ኤም.አር.]	Carcinogenic, mutagenic, reprotoxic substance = ካንሰር አምጪ፣ ዘረመልን የሚለውጥ ወይም መራቢያ አካላትን የሚጎዳ ንጥረ ነገር
COI [ሲ.ኦ.አይ.]	Cytochrome c oxidase subunit 1 gene ሳይቶክሮም ሲ ኦክሲዴዎዝ የሚባል ለዝርያ መለያ የሚያገለግል የዘረ መል ኮድ
CytB [ሲ.የይ.ቲ. ቢ.]	Cytochrome b gene = ሳይቶክሮም ቢ ጂን የሚባል ለዝርያ መለያ የሚያገለግል የዘረ መል ኮድ

ELISA [ኤላይዛ]	Enzyme-linked immunosorbent assay = ኤላይዛ የተባለ ምርመራ ዘዴ
EtOH [ኢ.ቲ.ኤኤች]	Ethanol = ኤታኖል የተባለ አልኮል
M199 [ኤም 199]	Medium 199 = ሚ.ዲ.የም 199 ተህዋሲያን ማሳደጊያ ፈሳሽ ዉህድ
MALDI-ToF MS [ማል.ዲ. ቶፍ ኤም ኤስ]	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry = ማል.ዲ. ቶፍ የተባለ በማትሪክስ የታገዘ ሌዘርን በመጠቀም የቁስ አካላትን ከብደትና ፍጥነት መለኪያ የትንተና ዘዴ
MEM [ኤም ኢ. ኤም]	Minimum essential media = ሚኒመም ኤሴንሻል ሚዲያ የሚባል ህዋሳትን ለማራባት የሚያገለግል ፈሳሽ ዉህድ
NGS [ኤን ጂ ኤስ]	Next-generation sequencing = ቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ ዘዴ
NNN [ኤን ኤን ኤን]	Novy-MacNeal-Nicolle medium = ኤን.ኤን.ኤን የተባለ ላይሽማኒያ በሽታ ህዋሰን ለማሳደግ የሚጠቅም ውህድ
PCR [ፒ.ሲ.አር]	Polymerase chain reaction = ፒሲአር የተባለ የዘረ መል ኮድን አባዝቶ መመርመሪያ ዘዴ
Lao PDR [ላኦ ፒ.ዲ.አር]	Lao People's Democratic Republic = የላኦ ሕዝባዊ ዲሞክራሲያዊ ሪፐብሊክ
PNOC [ፒ ኤን ኦ ሲ.]	Prepronociceptin gene = ፕሪፕሮናሲሲፒን የተባለ ዘረ መል ኮድ
qPCR [ኪ.ዉ. ፒ ሲ. አር]	Quantitative PCR (real-time PCR) = መጠናዊ ልኬትንና ወቅታዊ ዉጤትን የሚያሳይ የፒሲአር ምርመራ
RAPD [አር ኤ ፒ. ዲ.]	Random amplified polymorphic DNA = በነሲባዊ ሂደት የዘረ መል ኮድን(የዲኤንኤ)በማጉላት ዝርያን መለየት
RFLP [አር ኤፍ ኤል ፒ.]	Restriction fragment length polymorphism = የዲኤንኤ ቁርጥራጮች ርዝመትን በመለካት ዝርያን መለያ ዘዴ
RI [አር አይ.]	Refractive index = የብርሃን ነጸብራቅ አመልካች መለኪያ
RNases [አር ኤን ኤዝ]	Ribonucleases = የአርኤንኤ ዘረመልን አላሚ ኢንዛይሞች
RNASS [አር ኤን ኤ ኤስ ኤስ]	RNA stabilization solution = አርኤንኤን ሳይበላሽ የሚያቆይ አርጊ ዉህድ
RT-PCR [አር ቲ ፒ ሲ. አር]	Reverse transcription PCR = ቅልብስ ዘረ መል ቅጅ ፒሲአር (ከአርኤንኤ ወደ ዲኤንኤ በመቀየር የሚደረግ የፒሲአር ምርመራ)
TFA [ቲ ኤፍ ኤ]	Acide trifluoroacétique = ትራይፍሎሮአሴቲክ አሲድ የተባለ ዉህድ

3. ናሙናዎችን ከማቀነባበር በፊት የማከማቸት ዘዴዎች

ናሙናዎችን ለማዘጋጀት አምስት ዋና ዋና የትክለት (Fixation) ዘዴዎች አሉ፡-

3.1. ማቀዘቀዘ (Freezing)

ይህ ዘዴ በ-20 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ወይም ይበልጥ ተመራጭ በሆነው በ -80ድግሪ ሴንቲ ግሬድ የሙቀት መጠን ይከናወናል። በአሁኑ ጊዜ እነዚህ ዘዴዎች ከፊላሽ ናይትሮጅን (Liquid nitrogen) በላይ በስፋት ጥቅም ላይ ይውላሉ። በሁሉም ሁኔታዎች፣ ትንኞቹ እንዲደነዘዙ ከተደረገ በኋላ የማቀዘቀዘ ሂደቱ በአፋጣኝ መከናወን አለበት። በማቀዘቀዣ ውስጥ ማቆየት ነፍሳቱን ሙሉ በሙሉ ከመጠበቅም በላይ፣ አር ኤን ኤ (RNA)፣ ዲ ኤን ኤ (DNA) እና የፕሮቲኖች ይዘታቸው ሳይለወጥ ለረጅም ጊዜ ለማቆየት ይረዳል። በአንጻሩ፣ ፊላሽ ናይትሮጅን የትንኞቹን ክንፎች፣ እግሮች እና አንቴናዎች ሊሰባብርና ዋና ዋና መለያ ባህሪያትን ሊያጠፋ ይችላል። ደረቅ ማቀዘቀዣ (Dry freezer) ለናሙናዎቹ ደህንነት የተሻለ ቢሆንም፣ ተፈርካሽ የሆኑ የውስጥ አካላትን ለመጠበቅ ግን ተመራጭ አይደለም። ናሙናው ከበረዶ ሲቀልጥ (Thawing) ክንፎች፣ አንቴናዎች፣ ፓልፕ የሚባለው የአፍ ክፍልና እግሮች ከማጠራቀሚያው ብልቃጥ ጋር ስለሚጣበቁ ሊቀዳደዱ ይችላሉ። ይሁን እንጂ፣ ጥናቶች በመስክ በሚከናወኑበት ጊዜ ማቀዘቀዣ ወይም ፊላሽ ናይትሮጅን ስለማይገኝ ናሙናዎችን በጥልቅ ቅዝቃዜ ማቆየት አዳጋች ይሆናል። ናሙናን በጥልቅ ማቀዘቀዣ ውስጥ ማከማቸት ምንም ዓይነት የምርመራ ትክክለኛነት (sensitivity) ሳይቀንስ በሞለኪውላዊ ዘይቤዎች አማካኝነት በሽታ አምጪ ተህዋሲያንን ለመለየት ሙሉ በሙሉ ተስማሚ ነው። የአር.ኤን.ኤ (RNA) ቫይረሶች ለመለየት እና ነጥሎ ለማውጣት (isolation) እንዲሁም ለረጅም ጊዜ ለማቆየት በ-80ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ወይም በፊላሽ ናይትሮጅን ውስጥ ማቀዘቀዘ ይጠይቃል። ናሙናዎችን በጥልቅ ማቀዘቀዘ የሊሽማኒያ ተህዋሲያንን ከትንጅ ሆድ ለይቶ ለማውጣት አይመችም፤ ይህን ለማድረግ የሚቻለው ትንኞችን መጀመሪያ በፊላሽ ናይትሮጅን ትነት (Vapor phase) ውስጥ በማቆየት ቀጥሎም በፊላሽ ናይትሮጅን ውስጥ እንዲገቡ ከተደረገ ብቻ ነው (ለምሳሌ፡- ብልቃጦቹን [Vials] በስስ ካልሲ [Stocking] ውስጥ በማስገባት)፤ ይህም ከንዋኔ የሊሽማኒያ ተህዋሲያንን በቅዝቃዜ የመጠበቅ (Cryopreservation) ሂደትን የሚመስል ተግባር ነው።

3.2. በአልኮል ውስጥ ማከማቸት (Storage in alcohol)

ይህ ምናልባትም የአሸዋ ትንኞችን ለማቆየት በብዛት ጥቅም ላይ የሚውለው ዘዴ ነው። ላቦራቶሪ በሌላባቸው ራቅ ያሉ አካባቢዎችና አስቸጋሪ የመስክ ሁኔታዎች ለመተግበር አመቺ ነው። እንዲሁም አልኮል ለአካላዊ ቅርፅ (Morphology) ጥናት በጣም ተስማሚ ነው፤ የትንጅ ክንፎች፣ እግሮች እና አንቴናዎች በማከማቻ ብልቃጥ ውስጥ የአየር አረፋ ካልተፈጠረ ሳይሰበሩ ይቆያሉ። ስለዚህ የአየር አረፋን ለማስወገድ ብልቃጡን በትንሽ ጥጥ መዝጋትና የናሙናውን መለያ ምልክት (Label) ከጥጡ አናት ላይ ማድረግ ይመከራል (ምስል ቁጥር 1)

ናሙና ለረጅም ጊዜ በአልኮል ለማስቀመጥ የአልኮል ምጥነት (Concentration) የተለያዩ ግንዛቤዎች አሉ። በአጠቃላይ ከ70% በታች የሆነ አልኮል ምጥነት አይመከርም። ከፍተኛ ምጥነት ያለው አልኮል ዲ ኤን ኤን (DNA) ለረጅም ጊዜ ያቆያል፤ ነገር ግን ይህ ምጥነት ትንኞችን ተሰባባሪ (Brittle) ስለሚያደርጋቸው ለአካላዊ ቅርፅ ጥናቶች ተስማሚ አይደለም። የ96% ኢታናል (Ethanol) ምጥነት ርጉዕ ቅልቅል (Azeotrope mixture) ስለሆነ በተለይ እርጥበት አዘል በሆኑ ሞቃታማ ሀገራት የአልኮል ምጥነት ሳይቀንስ እንዲቆይ ይረዳል። ሆኖም ግን ከ96% የአልኮል ምጥነት ይልቅ በብዛት የሚገኘው 95% ነው።

የአልኮል ምጥነት ምንም ይሁን ምን፣ ዲ ኤን ኤ በአጠቃላይ በኢታናል ውስጥ በጥሩ ሁኔታ ይጠበቃል (ምንም እንኳን ከማቀዘቀዘ ዘዴ ጋር ሲነፃፀር በተለይም የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ (NGS) ዓይነት የዘረ-መል ምርመራዎች ውጤታማነቱ ዝቅ ያለ ቢሆንም)። ፕሮቲኖች ግን በጣም ዝቅተኛ የመቆየት ባህሪ አላቸው፤ በተለይም እንደ ማልዲ-ቶፍ (MALDI-ToF) ላሉ የፕሮቲን ጥናቶች (Proteomics)። በአልኮል ውስጥ ለጥቂት ወራት የቆዩ አሸዋ ትንኞችን በቅርፃቸው መለየት ይቻላል፤ ነገር ግን ከእነዚህ ናሙናዎች የማጣቀሻ የፕሮቲን መጠነ ድግግም መረጃዎችን (Spectra) ማመንጨት አይቻልም።

ናሙናን በ-20 ዲግሪ ሴንቲ ግሬድ ውስጥ ማቀዘቀዘ በአልኮል ወይም በደረቅ ሁኔታ ውስጥ የማቆየት ሂደቱን ለማሻሻል ያስችላል። በ-20 ዲግሪ ሴንቲ ግሬድ ማቀዘቀዘ በዋነኝነት የዘረ-መል መበላሸትን በመቀነስ ሞለኪውላዊ ጥራትን (ለምሳሌ የኑክሊክ አሲዶችን) ይጠብቃል፤ እንዲሁም የሕብረ ሕዋሳትን መፈራረስ በመቀነስ ለአካል ቅርፅ ማቆያ (Morphological preservation) ተጨማሪ ጥቅም ይሰጣል። ናሙናን ቢያንስ 70% በሆነ አልኮል ምጥነት ለጥቂት ወራት ማቆየት የዲ ኤን ኤ እና አር ኤን ኤ ቫይረሶችን ለመለየት ያስችላል።

በተጨማሪም፣ አይሶፕሮፒል አልኮል (Isopropyl alcohol) በአንዳንድ አገሮች በቀላሉ ሊገኝ ይችላል፤ እሱም ዲ ኤን ኤን ይጠብቃል ነገር ግን ናሙናዎቹ እንዲጠነክሩ (Stiff) ያደርጋቸዋል። እንደ ኢታናል በቀላሉ ተቀጣጣይ ባለመሆኑ ለማጓጓዝ ምቹ ነው። አስፈላጊ ሆኖ ሲገኝ፣ በፊላሽ ናይትሮጅን ወይም በደረቅ ማቀዘቀዣ ውስጥ የነበሩ አሸዋ ትንኞችን ወደ አልኮል ማዛር ይቻላል፤ ይህም የሁለቱንም ዘዴዎች ድክመቶች/ጉድለቶችን ያስወግዳል።



ምስል ቁጥር 1:- በአሸዋ ትንኞች በኢታናል (ethano) ውስጥ ተከማቸው ሲታዩ።

3.3. በአርኬንኤ ማረጋገጫ ፈሳሽ (RNASS) ውስጥ ማከማቻት

አር ኤን ኤ ኤስ ኤስ (RNASS) የተባለው ውሀማ ወህድ በስፋት ጥቅም ላይ የሚውልና፣ መርዛማ ያልሆነ፣ እና በህብረ ህዋስ እና በህዋስ ናሙናዎች ውስጥ የሚገኝ አርኬንኤን (RNA) ለማረጋገጥ እና ለመጠበቅ ታስቦ የተዘጋጀ ነው። ይህ ፈሳሽ በፍጥነት ወደ ናሙናው ውስጥ ዘልቆ በመጣትና አርኬንኤን የሚጎዱ ኢንዛይሞችን ሥራ በማሰናከል፣ ናሙናውን ወዲያውኑ ማቀዝቀዝ ሳያስፈልግ አርኬንኤው እንዳይበላሽ ይከላከላል። ናሙናዎችን በአር ኤን ኤ ኤስ ኤስ (RNASS) ውስጥ ማስቀመጥ የህብረ ህዋስ እና የህዋስ አካላዊ ቅርጽን በመጠበቅ ቀጣይ የስነ ህብረ ህዋሳዊ ምርመራዎች (histological assessment) ለማከናወን ይረዳል። አር ኤን ኤ ኤስ ኤስ (RNASS) ለናሙና ትክለት (Fixation) ባይጠቅምም አር ኤን ኤው እንዳይበላሽ ስለሚያደርግ፣ ለአጭር እና ለመካከለኛ ጊዜ ናሙናን ማቆየት የናሙናውን መቆራረድ ይዘት በጥሩ ሁኔታ እንዲጠበቅ ያግዛል።

አር ኤን ኤ ኤስ ኤስ (RNASS) ናሙናዎችን በመደበኛ የሙቀት መጠን እስከ 7 ቀናት፣ በ4 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ቅዝቃዜ ውስጥ ለተከታታይ ሳምንታት፣ ወይም በ -20 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ/-80 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ በማቆየት ለረጅም ጊዜ ማከማቻት ይቻላል። ይህ ዘዴ በተለይ የቅዝቃዜ ጥበቃ ስርዓት (Cold chain) መሠረተ ልማት ውስጥ በሆነባቸው የመስክ ሥራዎች ወይም ከሊኒኮች ውስጥ እጅግ ጠቃሚ ነው። አር ኤን ኤን (RNA) ከናሙና ወሲጥ ለማጣራት ብዙውን ጊዜ ናሙናዎቹን ከወህዱ ውስጥ ለይቶ ማውጣትና በመደበኛው የላቦራቶሪ ቅደም ተከተል መሠረት ማቀነባበር ይጠይቃል።

3.4. በመጠቀም ናሙናን በተመጣጣኝ ሙቀት (room temperature) ማቆየት

እርጥበት አልባ ናሙና ማቆያ ዘዴ (Dry preservation) የቆየ አስራር ሲሆን፣ ሙሉውን ናሙና (in toto) በደረቁ ለማንበር ሲሞከር እንደ ክንፎች፣ እግሮች፣ አንቴናዎች (antennae) እና ፓልፖች (palps) ያሉ ተሰባሪ አካላትን ይጎዳል። ሆኖም፣ እንደ ሲሊካ ጄል (Silica gel) ያሉ እርጥበት መምጫዎች ንጥረ ነገሮችን በመጠቀም ፈጣን ድርቀት (Dehydration) ከተከናወነ፣ በማልዲ-ቶፍ (MALDI-ToF) ማሽን የፕሮቲን ጥናቶችን ማድረግን አያውክም።

በአንጻሩ፣ በእነዚህ ናሙናዎች ላይ የዲ ኤን ኤ (DNA) ትንተና ማድረግ አስቸጋሪ ነው፣ ምክንያቱም ዲ ኤን ኤው የተቆራረጠና (Fragmented) እና ብዛቱም ያነሰ ስለሆነ። ይህም ማለት ከአዲስ ወይም ከቀዘቀዙ ናሙናዎች ጋር ሲነጻጸር ትንተናውን ፈታኝ ያደርገዋል (በተለይም ለኩክሌር ጂኖም ምርመራ)። ቢሆንም፣ እንደ "ሚወዚዮሚክስ" (Museomics) ያሉ ዘመናዊ ዘዴዎችን በእርጥበት አልባ ማቆያ ዘዴዎች ለተከማቹ ናሙናዎች መጠቀም ይቻላል። ሌላ አማራጭ ካልጠፋ በስተቀር እርጥበት አልባ ማቆያ ማከማቻ ዘዴዎች መጠቀም አይመከርም። የእርጥበት አልባ ማቆያ ዘዴዎችን ከቅዝቃዜ ዘዴ ጋር በማቀናጀት ብልቃጦችን በ -20°C ወይም -80°C ማቀዝቀዣ ውስጥ ማስቀመጥ ይቻላል። በዚህ ዘዴ ውስጥ ዋናው ተግዳሮት ለዘርያ መለያ (Identification) የሚያስፈልጉትን የሰውነት ክፍሎች በትክክል ስላይድ ላይ ማንበር (Mounting) አለመቻል ነው። ይህንን ለማድረግ ደግሞ ናሙናውን ዳግም ማርጠብ (Rehydration) አስፈላጊ ነው። ለዚህም የትራይተን ኤክስ100 (Triton X-100) ወህድ መጠቀም ይመከራል። የማርጠብ ሂደቱ እንደ ሁኔታው ከጥቂት ሰዓታት እስከ ጥቂት ቀናት ሊወስድ ይችላል፤ በዚህ ጊዜም ናሙናውን በቅርብ መከታተል ያስፈልጋል። ሙሉ በሙሉ ከረጠበ በኋላ፣ ናሙናዎቹ በሦስት ተከታታይ የውሃ መታጠቢያዎች (Water baths) ውስጥ መታጠብ አለባቸው።

3.5. በናሙና ማቆያ ወረቀቶች (Filter papers) ላይ ማቆየት

የናሙና ማቆያ ወረቀቶች (Filter papers) ዋና ጥቅማቸው በደረቁ የተቀመጡ ሙሉ ነፍሳትን ወይም የደም ህዋሳትን በተመጣጣኝ ሙቀት (room temperature) ሳይበላሹ በማከማቻት የዘረ-መል ዲ ኤን ኤን (Genomic DNA) ለረጅም ጊዜ በጽናት ማቆየት ማስቻላቸው ነው። የናሙና ማቆያ ወረቀቱ በትንሽ ካርድ መልክ የሚዘጋጅ በመሆኑ፣ በመቶዎች የሚቆጠሩ ናሙናዎችን የአንድን ትንሽ ጠረጴዛ መሳቢያ በሚያክል ቦታ ውስጥ በመደበኛ ሙቀት ማከማቻት ይቻላል። የወረቀቱ ይዘት ተላላፊ በሽታ አምጪ ተህዋሲያንን በሚያስወግዱ (Denature) ንጥረ ነገሮች የተነከረ በመሆኑ፣ ናሙናዎቹ እንደ አደገኛ ሕይወጠንቅ (Biohazard) አይቆጠሩም። ይህ ደግሞ ናሙናዎችን ያለ ምንም ሕይወጠንቅ ጥንቃቄዎች ለማከማቻትና ለማጓጓዝ ያስችላል። [68]

4. ፍሙናዎች መበለት (Specimen dissection)

ሌሎች ነፍሳት ዝርያቸው የሚለየው ሙሉ በሙሉ ተስከተው በሚታዩ ውጫዊ ባህሪያቸው ነው። አሸዋ ትንኞች በአንጻሩ ትክክለኛ ዝርያቸውን ለመለየት የአካል ክፍሎች መበለት እና በጥልቅ ለማጥናት ፍሙናዎችን በሰላይድ ላይ ማንበር ያስፈልጋል። የተመረጠው የዝግጅት እና ፍሙናን የማንበር ሂደት ምንም ይሁን ምን፣ ጥቅም ላይ የሚውለው የአካል መበለት ዘዴ ተመሳሳይ ነው (ምስል 2 እና 3 ይመልከቱ) (<https://zenodo.org/records/18198006>).

ትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) አጠቃቀም፡- አየኒክ ያልሆነ ዉሀማ ዉህድ (non-ionic aqueous solution)

በአጠቃላይ ፍሙናን የማንበር ሂደት የሚመለከተው አዲስ የተያዙ ወይም በአግባቡ የቆዩ ፍሙናዎች ነው። አብዛኞቹ የነፍሳት ፍሙናዎች በደረቁ ለማልዲ-ቶፍ ጥቅም (MALDI-ToF) ወይም በአልኮል ውስጥ ለብዙ ዓመታት የተከማቹ ሊሆኑ ይችላሉ። ነገር ግን ፍሙናዎችን ለረጅም ዓመታት በአልኮል ውስጥ ማቆየት ተመራጭ አይደለም፤ በዚህ መንገድ የቆዩ ነፍሳት (arthropods) በአጉሊ መነጻር ለመታየት ዝግጁ እንዲሆኑ ማድረግ በጣም አስቸጋሪ ነው። ብዙውን ጊዜ የሚያጋጥመው ችግር ፍሙናዎቹ የተቀመጡበት የፕላስቲክ ዕቃ በእርጅና ምክንያት ስለሚበላሽ አልኮል እንዲተን ያደርጋል። በሁለቱም ሁኔታዎች ፍሙናዎቹ በአልኮል ውስጥ በጣም ስለሚቆዩ ወይም ስለሚደርቁ አማራጮቻችን ጠባብ ይሆናሉ፤ ምክንያቱም ፍሙናዎቹ በአልኮል ውስጥ ለረጅም ጊዜ ቆይተዋል ወይም ደርቀዋል። ስለሆነም፣ ጠንካራ ሳሙና ያልሆኑ ማለስለሻ ንጥረ ነገሮችን (Wetting agents) ለምሳሌ ትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) መጠቀም አስፈላጊ ይሆናል። ትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) አየኒክ ያልሆነ ዉሀማ ዉህድ (non-ionic detergent) ሲሆን፣ በሴል እና በሞለኪውላር ባዮሎጂ ዘርፍ በሰፋት ጥቅም ላይ ይውላል። የህዋስ እና የህዋስ አስኳል ሽፋንን (Cell membrane) አሰራጊ (permeabilization) የማድረግ ችሎታ አለው። ከዚህ በታች 0.5% ዉሀማ ዉህድ የሆነውን ትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) በመጠቀም የሚከናወን የአሠራር ቅደም-ተከተል ቀርቧል፡-

- የደረቀውን ፍሙና በዉሀ አልባ አልኮል (absolute alcohol) ማራሰ።
- ሙሉውን ፍሙና ሊዘፍቅ የሚያስችል 0.5% ትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) ዉህድ መጨምር።
- ሂደቱን በየጊዜው እየተከታተሉ ከ 5 ደቂቃ እስከ ብዙ ቀናት እንዲቆይ ማድረግ። ሁሉም የነፍሳቱ አካላት በዉህዱ ውስጥ ሙሉ በሙሉ መለስለስ አለባቸው።
- ቀጥሎም የትራይተን ኤክስ100 (Triton X100) ዉህድን በማስወገድ በፖታሽየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) ዉህድ መተካት።

4.1. ራስ (Head)

የአሸዋ ትንኞችን አካል መበለት የሚከናወነው ስቴሪዮ-ማይክሮስኮፕ (stereomicroscope) በመጠቀም በቀጫጭን መርፌዎች ወይም በነፍሳት መርፌዎች (entomological pins) አማካኝነት ነው (ምስል 2 እና 3)። በብዛት ጥቅም ላይ የሚውሉት መርፌዎች፡- 26G x 1/2" (0.45 x 13 ሚሜ)፣ 30G x 1/2" (0.3 x 13 ሚሜ)፣ ወይም 25G x 5/8" (0.5 x 16 ሚሜ) ናቸው። የትንኛን ዝርያ ለመለየት እንዲያመች፣ ቢያንስ ጭንቅላቱ ከሰውነቱ ተለይቶ የምግብ መፍጫና ማስተላለፊያ ቧንቧ (cibarium) እና የጉሮሮ (pharynx) ክፍሎችን ለማየት በጀርባ ማስተኛት (ventral side up) ያስፈልጋል። ደረትና ሆድ ደግሞ ከተገነጠሉ በኋላ በጎናቸው (laterally) ይቆመጣሉ። የራስ ቅሉ ቀዳዳ (occipital foramen) ወደ ላይ እንዲዞር፤

ጭንቅላቱን በፊት በኩል (ventro-dorsal) ማስተኛት ያስፈልጋል። ይህም አቀማመጥ የምግብ መፍጫና ማስተላለፊያ ቧንቧ (cibarium) በቀጥታ ለመመልከት ያስችላል። ጭንቅላቱ ሙሉ በሙሉ ከተገነጠል እነዚህን የሰውነት ክፍሎች በቀላሉ ለማየት ያስችላል።

4.2. ከንፎች እና ደረት (Wings and thorax)

የአሸዋ ትንኞችን ከንፎች ለማንበር በቅጡ ተዘርግተው (flat) መቀመጥ አለባቸው። እያንዳንዱ ከንፍ ከሥሩ ተገንጥሎ ለብቻው ማንበር ይቻላል፤ ወይም አንደኛውን ከንፍ ብቻ ገንጥሎ በማንበር ሌላኛው ከደረት ጋር ተያይዞ እንዲቀር ማድረግ ይቻላል። የጂኦሞርፎሎጂ ልኬት (geometric morphometry) ትንተና የታቀደ ከሆነ፣ ከማንበር በፊት ቀኝ እና ግራ ከንፎችን በትክክል መለየት እና ምልክት ማድረግ አስፈላጊ ነው። የትንኛ ደረት በበርካታ ክፍሎች የተከፈለ ሲሆን፣ እያንዳንዱ ክፍል በጣም አስፈላጊ የሆኑ የዝርያ ምደባ (Taxonomy) መረጃዎችን ይዟል [20, 64]። በአጠቃላይ የጸጉር ስሮችን (chetotaxy) እና የቀለም ስርጭትን ለመመርመር እንዲቻል ደረቱን በጎን በኩል ባለው እይታ (lateral view) ማንበር ያስፈልጋል። በአንዳንድ የደረት ክፍሎች ላይ የሚገኙ የጸጉር ጠባባዎች (scars of bristles) የ *Brumptomyia* ዝርያዎችን ለመለየት ያገለግላሉ። የቀለም ስርጭቱ የኒዮትሮፒካል አሸዋ ትንኞችን በዝርያ ደረጃ (ለምሳሌ፡- *Bichromomyia*)፣ የዝርያ ቡድኖች (ለምሳሌ፡- *Pintomyia*)፣ ወይም በአንድ ዝርያ ውስጥ ያሉ ንዑስ ዝርያዎችን (ለምሳሌ፡- *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, እና *Psychodopygus*) ለመለየት ጥቅም ላይ ሊውል ይችላል [20]። ስለሆነም፣ ደረቱ ለሞለኪውላር ትንተና የማይውል ከሆነ፣ ሳይበላሽ በጥንቃቄ ማንበር ያስፈልጋል። አለበት። ዋናው ነጥብ፣ የቀለሙ ድምቀት ሳይሆን ቀለሙ በደረት ላይ ያለው ስርጭት መሆኑን ልብ ማለት ያስፈልጋል። ስለዚህ ፍሙናውን የማጽዳት ሂደት (clarification process) ቀለሙን ወይም የቀለም ቅርጹን አያጠፋውም።

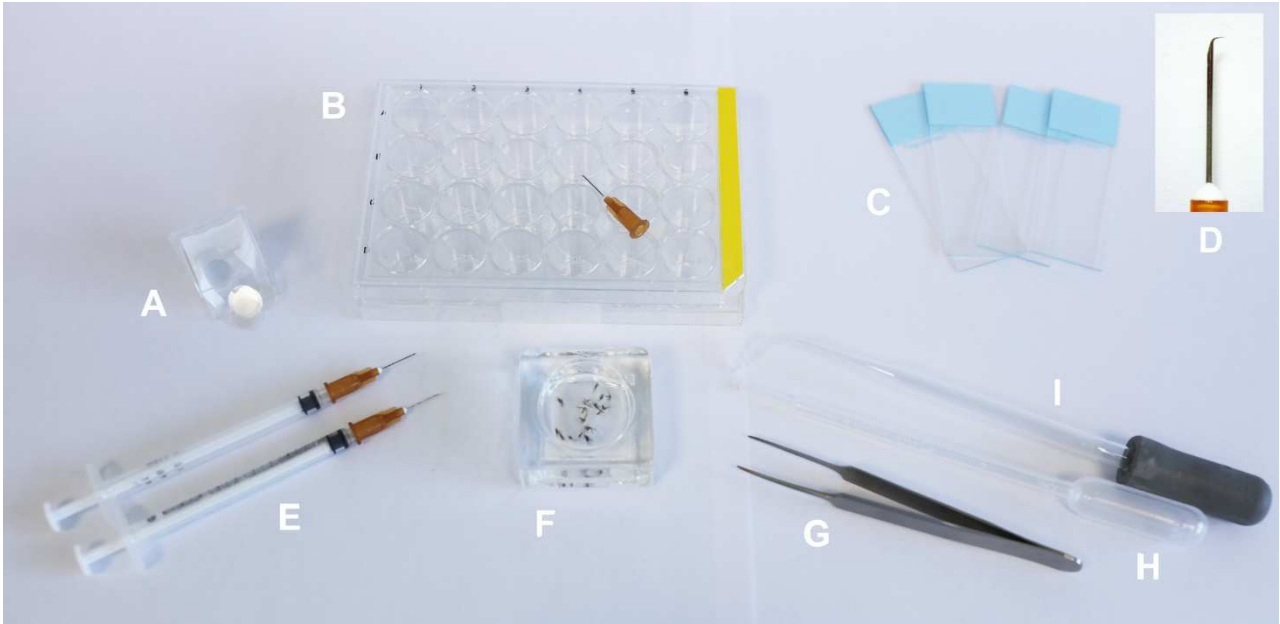
4.3. መራቢያ አካላት (Genitalia)

የአሸዋ ትንኞችን በወገን (genera)፣ ንዑስ ወገን (subgenera) እና በዝርያ (species) ለመለየት መራቢያ አካላት ወሳኝ በመሆናቸው፣ የወንድም ሆነ የሴት መራቢያ አካላትን በጥንቃቄ ማንበር ያስፈልጋል። የመራቢያ አካላት በሁለቱም ጾታዎች ውስጥ በጥንድ በጥንድ የተቀመጡ ናቸው።

4.3.1. ወንዶች (Males)

የወንድ መራቢያ አካላት በውጭ የሚገኙ ሲሆን፣ ጥንድ የሆኑ መቆንጠጫዎችን (forceps) ይይዛሉ። እያንዳንዱ መቆንጠጫ በጀርባው ክፍል የጎኖኮክሳይት-ጎኖስታይል (gonocoxite-gonostyle) መጋጠሚያን፣ በታችኛው (ventral) ክፍሉ ደግሞ የኢፓንድሪያል ሎብን (epandrial lobe) ይይዛል። ጎኖስታይል (Gonostyle)፣ እሾህ መሰል መዋቅሮችን (spines) እና አንዳንዴም ረገጥኞችን (setae) ይይዛል። እነዚህ እሾሆች ሊቆጠሩ የሚችሉ እና የተሰኩበት ቦታ በግልጽ የሚታይ መሆን አለበት። ጎኖኮክሳይት (Gonocoxite)፣ የውስጠኛው ገጽ በጥንቃቄ መታየት አለበት፤ ምክንያቱም በቀጥታ ከቆዳው ላይ የወጡ ወይም በትንሽ እብጠት (tubercle) ላይ ያሉ የጸጉር ስብስቦችን ሊይዝ ይችላል [22]።

በአሸዋ ትንኛ አካል ብለታ አነስተኛ ልምድ ያላቸው ባለሙያዎች፣ መራቢያ አካሉን ከሆድ ዕቃው መጨረሻ ላይ ሳይነቅሉ ቀጥታ በጎን በኩል (lateral mounting) ማንበር ይችላሉ (<https://zenodo.org/records/18311158>) ። በዚህ ሁኔታ፣ ሁለቱ የመራቢያ አካላት አንዱ በሌላው ላይ ስለሚደረራረቡ፣ በጎኖኮክሳይት ውስጥ ያሉትን ጸጉሮች ለመቁጠር አስቸጋሪ ቢሆንም፣ ነገር ግን ይህ ዘዴ በመበለት ሂደቱ ባልመሳካቱ ምክንያት አካሉ እንዳይበላሽ ይረዳል።



ምስል 2:- አሸዋ ትንኞችን ለማንበር የሚያስፈልጉ ቁሳቁሶች : A:- ክብ የሸፋን መስተዋቶች (Coverslips)፤ ከ10 እስከ 12 ሚሊ ሜትር ዲያሜትር ያላቸው።

B:- 24 ቀዳዳዎች ያሉት ፕሌት (24-well plate) እና ጥምዝ መርፌ (hooked needle)። (ልብ ይበሉ:- ትንኞቹን ለማቀነባበር የቅርንፍድ ዘይት (clove oil) ወይም ዩፓራል (Euparal®) የምንጠቀም ከሆነ፤ የአክሪክ (acrylic) ፕሌቶች አይጠቀሙ፤ ምክንያቱም ኬሚካላዊ ምላሽ ስለሚፈጠር ናሙናዎቹ ሊበላሹ ይችላሉ)።

C:- መለያ (Label) ለመለጠፍ አመቺ የሆኑ የመስታወት ስላይዶች።

D:- የመርፌው ጥምዝ ጫፍ ዝርዝር እይታ።

E:- ከሲሪንጅ ጋር የተገጠሙ መርፌዎች።

F:- አሸዋ ትንኞችን ለማስቀመጥ የሚያገለግል የእጅ ሰዓትን የሚያክል መስታወት (watch glass) ወይም ተመሳሳይ መያዣ።

G:- የዱሞንት መቆንጠጫ (Dumont forceps)

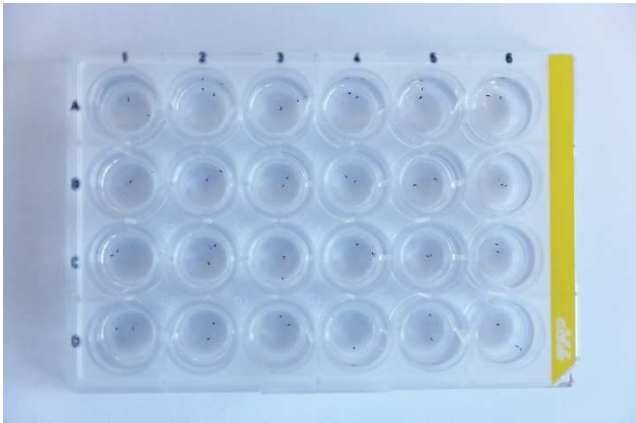
H:- ከላስቲክ የተሰራ ፕጅት (መምጠጫ)።

I:- ፈሳሽን ወደ ቀዳዳዎቹ (wells) በቀላሉ ለማስተላለፍ እንዲረዳ በእሳት በማሞቅ የታጠፈ የመስታወት ፕጅት።

በሥራው ላይ ልምድ ያላቸው ባለሙያዎች ግን መራቢያ አካሉን ለሁለት ክፍሎች ለመዘርጋት ሊሞክሩ ይችላሉ። ይህንን ለማድረግ የመርፌው የተቆረጠ ሹል ጎን (እንደ ኢንትራደርማል መርፌ ዓይነት) በመጠቀም፣ የጎኖኮክሳይት-ጎኖስታይል ስብስቦችን ሙሉ በሙሉ ሳይቆረጡ በመጠል መዘርጋት ያስፈልጋል (<https://zenodo.org/records/18311158>) ። በዚህ መንገድ የውስጠኛውን ገጽታ መመልከት ቀላል ይሆናል። ይህ ዓይነቱ አዘገጃጀት አንዱ በሌላው ላይ ተደራርቦ የሚታዩትን ፓራሜሮች (parameres) እና የፓራሜሮ ሽፋኖችን (parameral sheaths) በግልጽ ለማየት ይረዳል። በጎን በኩል ለማንበር (lateral mounting) የአካል ክፍሎች መደራረብ ስለሚኖር፣ ናሙናዎቹ ቢደንብ የጠሩ (cleared) መሆን አለባቸው።

4.3.2. ሴቶች (Females)

የሴት መራቢያ አካላት በሰውነት ውስጥ የሚገኙ ሲሆን፣ በዋነኝነት የወንዴ ዘር ማከማቻ ክረጢትን (spermathecae) ያካትታሉ። የወንዴ ዘር ማከማቻ ክረጢትን የትንኛን አካል መበለት (dissection) ሳያስፈልግ በሰውነት ቆዳ ውስጥ (tegument) በቀጥታ መመልከት ይቻላል። ይህንንም ማድረግ የሚቻለው ሆድ ዕቃውን በፊት በኩል (ventral position) በማንበር ነው። የወንዴ ዘር ማከማቻ ክረጢቱ በየትኛውም የማንበሪያ ወህድ ቢቀመጥም



ምስል 3:- ባለ 24 ቀዳዳ ሳህን (24-well plate). እያንዳንዱ ቀዳዳ (well) የአሸዋ ትንኞችን ራስ እና የሆድ ዕቃ ጫፍ (መራቢያ አካል ያለበትን ክፍል) ይዟል። ይህ ዝግጅት ብዙ ናሙናዎችን በአንድ ጊዜ ለማቀነባበር እና ዝርያቸውን ለመለየት ይረዳል።

በግልፅ ይታያል። በተለይም የከረጢቱ አካል ሽካራና በደንብ ያልጠራ ከሆነ፡ ሆኖም ግን፣ ለስላሳና ቀጭን ግድግዳ ያላቸውን ከረጢቶችን ብርሃን በማያሳልፉ (Poorly refractile) ወይም ውስጥ ማየት አስቸጋሪ ሊሆን ይችላል።

በተጨማሪም፣ በቀዳሚው ዓለም ክፍል (Old World) ውስጥ የላይሽማኒያ ኢንፋንቲም (*Leishmania infantum*) ዋና አስተላላፊ የሆኑት እንደ *Larrousius* ያሉ ንዑስ ዝርያዎችን ለመለየት የወንዶ ዘር ማከማቻ ከረጢት ቱቦ ታችኛውን ክፍል (base of the spermathecal ducts) መመልከት አስፈላጊ ነው [35, 37, 38]። ያለበለዚያ ዝርያን መለየት አዳጋች ነው። እነዚህን የምልክታ ችግሮች ለመፍታት የወንዶ ዘር ማከማቻ ከረጢት ሹካውን (genital furca-spermathecae) ከሆድ ዕቃው ለይቶ ማውጣት ያስፈልጋል። (<https://zenodo.org/records/1831106>)

በአጠቃላይ በትንሹ የመበለት ሂደት ውስጥ የወንዶ ዘር ማከማቻ ከረጢትን (spermathecae ለማየት አስቸጋሪ ነው፤ ነገር ግን የመራቢያ አካል ሹካውን (genital furca) ማግኘት በአንጻራዊ ሁኔታ ቀላል ነው። የማከማቻ ቱቦዎቹ የሚከፈቱት ወደዚህ ሹካ ውስጥ ስለሆነ፣ ሹካውን ለይቶ ማውጣት ብዙውን ጊዜ ማከማቻዎቹንም አብሮ ለማውጣት ያስችላል። በመንጠሉ ሂደት ማከማቻዎቹ በስህተት ቢቆረጡ እንኳ በሆድ ዕቃው ቆዳ ሽፋን ውስጥ ሆነው ሊታዩ ይችላሉ (ምስል 4 ይመልከቱ)።

4.4. የላሽማኒያ ተህዋሲ ንጠላ የሚከናወን የሆድ ዕቃ (Midgut) ብሊታ

በሴት አሸዋ ትንሹ ውስጥ የላሽማኒያ ጥገኛ ተህዋሲያንን ለማግኘት እና ለይቶ ለማውጣት የትንሹን የምግብ መፍጫ አካል መበለት አስፈላጊ ነው። ይህ አሠራር የትንሹን በሽታ የማስተላለፍ ብቃት (vectorial competence) ለመገምገም በመስከም ሆነ በላቦራቶሪ ውስጥ ሊከናወን ይችላል።

የግንጥላወ ክንዋኔ በቅርብ በተገደሉ ሴት ትንሹ ላይ ቢደረግ ይመከራል። በቅድሚያ ትንሹ ላይ ያሉትን ትርፍ ጸጉሮች ለማስወገድ ለስላሳ ሳሙና ባለው ውሃ ወይም በጨው ወይም (saline solution) አጠባብቅ። ይህ ክንዋኔ ትንሹን ለመለየት የሚያስፈልጉትን አካላዊ ባህሪያት ሳይቀይር፣ የላይሽማኒያ ተህዋሲን የመንጠል ሂደቱ በንጹህ (aseptic) ሁኔታ እንዲከናወን ይረዳል። የላይሽማኒያ ጥገኛ ተህዋሲያንን ለማግኘት እና ለመለየት፣ የሆድ ዕቃውን (midgut) በጥንቃቄ በማወጣት ከበሽታ አምች ተህዋሲያን በፀዳ አንድ ጠብታ የጨው ወይም (sterile 0.9% NaCl) ውስጥ ማኖር ያስፈልጋል። ተንቀሳቃሽ የላይሽማኒያ ጥገኛ ተህዋሲያንን በአጉሊ መነጻጸር (የሚመከር ማጉያ፡ -200x) ከታዩ፣ የጨው ወይምን በኢንሱሊን ሲሪንጅ ወይም ሳቢ ቱቦ (micropipette) በመምጠጥ ወደ ማሳደጊያ ወይም (cultivation medium) መዛወር አለባቸው። (ለበለጠ መረጃ ምዕራፍ 4.4.3ን ይመልከቱ)።

የትንሹን ጭንቅላትና እና የመራቢያ አካል ለማጽዳት በቀጥታ ማርክ አንድሬ (Marc-André) ውስጥ ማስቀመጥ ያስፈልጋል። በዚህም ጊዜ የማርክ አንድሬ (Marc-André) ወይም የላይሽማኒያ ተህዋሲያን ገዳይ በመሆኑ በቀጥታም ሆነ በተዘዋዋሪ፣ በመሳሪያዎች ወይም በመርሬዎች አማካኝነት እንዳይነካካ ጥንቃቄ ማድረግ ያስፈልጋል።

የሴት አሸዋ ትንሹ መበለት አንድ ወይም ሁለት ስላይዶች በመጠቀም ሊከናወን ይችላል፤ ሁለቱም አማራጮች የራሳቸው ጥቅምና ገደብ አሏቸው (ምስል 5፣ <https://zenodo.org/records/1831154>) ።

4.4.1. ሁለት ስላይዶች በመጠቀም ንጠላ ዘዴ (Two-slides method)

የመጀመሪያው የተህዋሲያን ንጠላ መንገድ ሁለት የተለያዩ ስላይዶች በመጠቀም ሲሆን፡- አንደኛው ስላይድ የምግብ መፍጫ ቱቦውን (Midgut) ለማውጣት የሚያገለግል ከበሽታ ተህዋሲያን የፀዳ ወይም (Sterile saline) የያዘ ሲሆን ፣ ሁለተኛው ደግሞ የትንሹን ጭንቅላት እና የዘር ማከማቻ ከረጢት (Spermathecae) በ'ማርክ-አንድሬ' (Marc-André) ወይም ለማንበር የሚያገለግል ነው።

ሆኖም፣ በመስክ የሥራ ሁኔታ ላይ ሁለት ወይም ሦስት ሰዎች ትንሹን በልተው፣ ዝርያውን ለሚለየውና በምግብ መፍጫ ቱቦ ውስጥ የሊሽማኒያ ኢንፌክሽን መኖሩን ለሚመረምረው ሌላ ተመራማሪ ማቀበል የተለመደ ነው። በዚህ ጊዜ ሁለት ስላይዶችን በአንድ ላይ ማስተናገድ የናሙናዎችን ዱካ መከታተያ (Traceability) ሊያዘበራርቅ ይችላል፤ በተለይም በአንድ ትንሹ አንጀት ውስጥ ኢንፌክሽን ቢገኝ፣ የተከለሰው ትንሹ የትኛው እንደነበረች በእርግጠኝነት ለማወቅ አስቸጋሪ ያደርገዋል (<https://zenodo.org/records/1831154>)።

4.4.2. አንድ ስላይድን በመጠቀም ንጠላ ዘዴ (Single-slide method)

ሁለተኛው የተህዋሲያን ንጠላ መንገድ አንድ ስላይድ ብቻ መጠቀም ሲሆን ይህም የናሙናዎችን ዱካ ለመከታተል (traceability) ያስችላል። ሆኖም ግን፣ በርካታ ጥንቃቄዎች መወሰድ አለባቸው። ከበሽታ አምጭ ተህዋሲያን ፅዱካነትን (sterility) ለማረጋገጥ፣ ባለሙያዎች እጃቸውን በየጊዜው በሃይድሮ-አልኮሆል ጄል (hydroalcoholic gel) ማጽዳት አለባቸው። ስላይዶች (non-frosted) እና ባለ አራት ማዕዘን የሸፋን መስተዋቶች (22 x 22 ሚ.ሜ) በአሉሚኒየም ፎይል ተጠቅልለው በደረቅ መቀት (በፑፒኔል ምድጃ/Poupinel oven) የጸዱ መሆን አለባቸው ፣ እንዲሁም ለአያንዳንዱ ብለታ የሚሆኑ ንጹህ መርሬዎች (ተመራጭ ፡ 25G Ø 0.5mm x 16mm) ጥቅም ላይ መዋል አለባቸው።

አሸዋ ትንሹ በስላይዱ ማሃል ላይ ባለ ንጹህ የጨው ወይም (saline) ጠብታ ውስጥ ትቀመጣለች። የምግብ መፍጫ አካልን (digestive tract) ሳይቆርጡ ጭንቅላቱን መንጠል እና በ6ኛው እና በ7ኛው የሆድ ክፍሎች (abdominal tergites and sternites) መካከል ቀዳዳ መፍጠር ያስፈልጋል (በጣም ረጅም የዘር ማከማቻዎች/spermathecae ይኖራሉ ተብሎ የሚጠበቅ ከሆነ ከመገጠሚያው ክፍ ብሎ መሰንጠቅ ይቻላል)። በመቀጠል፣ ደረቱን (thorax) በአንድ መርሬ እንዳይንቀሳቀስ በማፈን፣ በሌላኛው መርሬ የሆድ ዕቃውን የመጨረሻ ክፍሎች በቀስታ በመሳብ የምግብ መፍጫ አካሉን(gut) ማውጣት ያስፈልጋል።

ይህ ካልተሳካ፣ የሆድ ዕቃውን የመጨረሻ ጫና በመርሬ በማፈን የፊተኛውን የምግብ መፍጫ አካል (anterior part) የመሳብ አማራጭ አለ። ይህ ካልተሳካ ደግሞ፣ በምግብ መፍጫ አካል ዙሪያ ያለውን የቀረ የሰውነት ክፍል በተቻለ መጠን በማስወገድ፣የምግብ መፍጫ አካሉን ማውጣት ያስፈልጋል። የምግብ መፍጫ አካሉ ከወጣ በኋላ የመጨረሻውን የሆድ ዕቃ ክፍል በመቆረጥ ነጥሎ ማወጣት ያስፈልጋል።

በመቀጠል የምግብ መፍጫ አካሉ በስላይዱ በአንድ በኩል በተቀመጠ አዲስ ንጹህ የጨው ወይም ጠብታ ውስጥ ይደረጋል፤ ከዚያም በንጹህ የሸፋን መስተዋት በቀስታ ይሸፈናል። ጭንቅላቱ እና የመጨረሻዎቹ የሆድ ዕቃ ክፍሎች በስላይዱ በሌላኛው ጫና ላይ ባለ ትንሽ የማርክ አንድሬ (Marc-André) ወይም ጠብታ ውስጥ ይዛወራሉ (ይህም ከላይሽማኒያ ጋር

ምንም ዓይነት ንክኪ አለመኖሩን በማረጋገጥ ነው። ጭንቅላቱ በትክክለኛው አቅጣጫ (የራስ ቅሉ ቀዳዳ ወደ ላይ) ይደረጋል፤ የዘር ማከማቻ ከረጢቱ (spermathecae) ከላይ እንደተጠቀሰው ከመራቢያ አካል ሹካ ጋር ሆነው በትንሽ ክብ የሽፋን መስተዋት [ፀ 12 ሚሜ] (ማስታወሻ፣ የካሬው የሽፋን መስተዋት መጠቀም አይመከርም) ይሸፈናሉ። የቀረው የአሸዋ ትንጅ አካል እና ክንፎች በስላይዱ መሃል ባለው የጨው ዉህድ ጠብታ ውስጥ ይቀራሉ (<https://zenodo.org/records/18311154>).

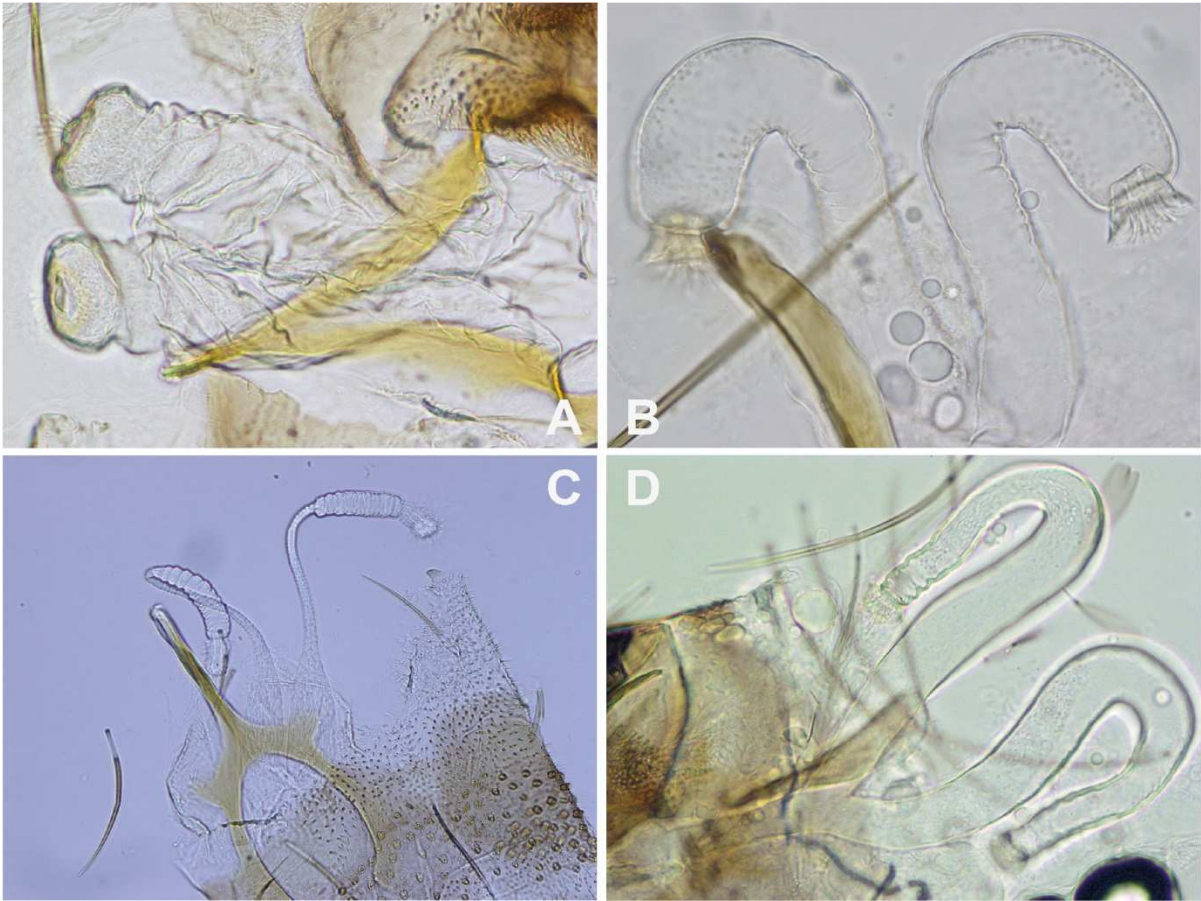
ጥገኛ ተህዋሲያን ከተገኙ እና የዘርያ ምደባ ጥናት ካሰፈለገ፣ ደረቱ እና ሆዱ ለሞለኪውላር ወይም ለፕሮቲን ጥናቶች ሊቀመጡ ይችላሉ፤ ክንፎቹ ደግሞ በዉህማ ዉህድ ውስጥ ማስቀመጥ ይቻላል። የተቀመጠውን ናሙና ለረጅም ጊዜ ለማቆየት፣ ከመጠን ያለፈ የማርክ አንድሬ (Marc-André) ዉህድ በክሎራል ገም (Gum Chloral) ወይም በፖሊቪኒል (PVA) አልኮል ሊተካ ይችላል።

የሚከተሉት የቪዲዮ ቅጂዎች እነዚህን ሂደቶች በዝርዝር ስለሚያሳዩ እዚህ ላይ ዝርዝር ማብራሪያ አይሰጥባቸውም። (የአሸዋ ትንጅ የምግብ መፍጫ አካልን መበለት፡- <https://zenodo.org/records/18303014> እና የአሸዋ ትንጅ የምራቅ አጢ መበለት፡- <https://zenodo.org/records/18302850>) ።

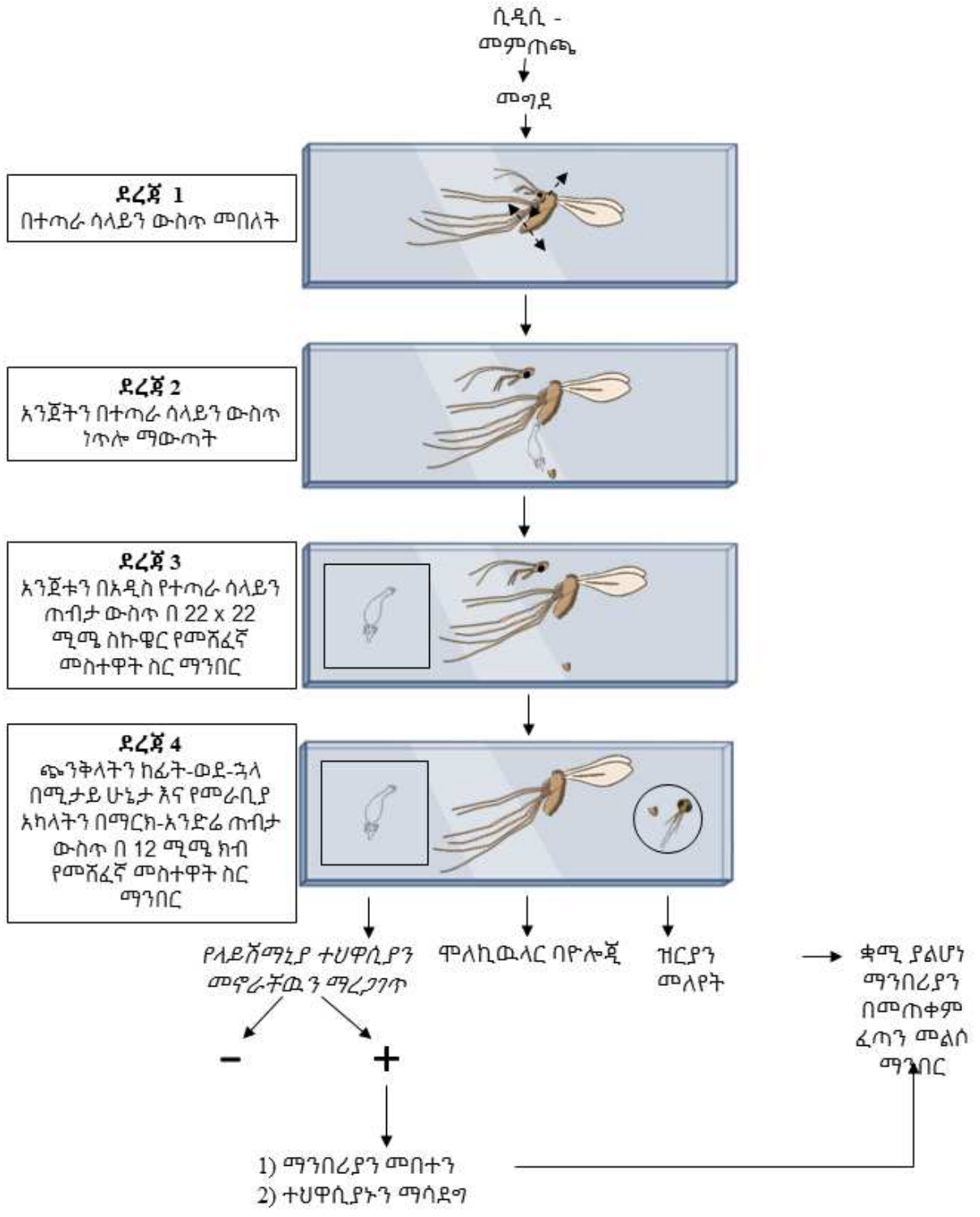
4.4.3. የላይሽማኒያ ጥገኛ ተህዋሲያንን ከአሸዋ ትንጅ ሆድ ዕቃ ንጠላ እና ማሳደግ

የላይሽማኒያ ተህዋሲ ተሸካሚ ከሆኑ ሴት አሸዋ ትንጅ ላይ ጥገኛ ተህዋሲያንን ለይቶ ማውጣት ከፍተኛ ክህሎት የሚጠይቅ ረቂቅ ተግባር ሲሆን፣ መጀመሪያ ጥገኛ ተህዋሲያን በሌለባቸው ናሙናዎች ላይ ልምምድ ሊደረግበት ይገባል። የትንጅ አካል ከተገነጣጠለ በኋላ፣ የሆድ ዕቃዎቹ (guts) እንዲታጠቡ ወደ አዲስ ከደቂቅ ህዋስ (ማይክሮብ) የጨው ዉህድ (0.9% NaCl) ወይም የሎክስ (Locke's) ዉህድ ይዛወራሉ [4]። የተገነጠሉት የሆድ ዕቃ ክፍሎች በሁለት መንገድ ሊቀነባበሩ ይችላሉ፡-

ልዩ ልዩ የፕሮማስቲጎትን (promastigote) የእድገት ደረጃዎች እና መገኛ ቦታቸውን በአገሊ መነጽር መመርመር (በተለይም ለስቶሞዲያል ቫልቭ (stomodaeal valve) ልዩ ትኩረት መስጠት)።



ምስል 4፡- ከተበለቱ አዳዲስ ናሙናዎች የተገኙና በ "Marc-André" ዉህድ ውስጥ የተቀመጡ የወንዶ ዘር ማከማቻ ከረጢቶች (Spermathecae). A: *Idiophlebotomus longiforceps* (RDP Laos); B: *Sergentomyia minuta* (France); C: *Phlebotomus ariasi* (France); D: *Sergentomyia anodontis* (RDP Laos).

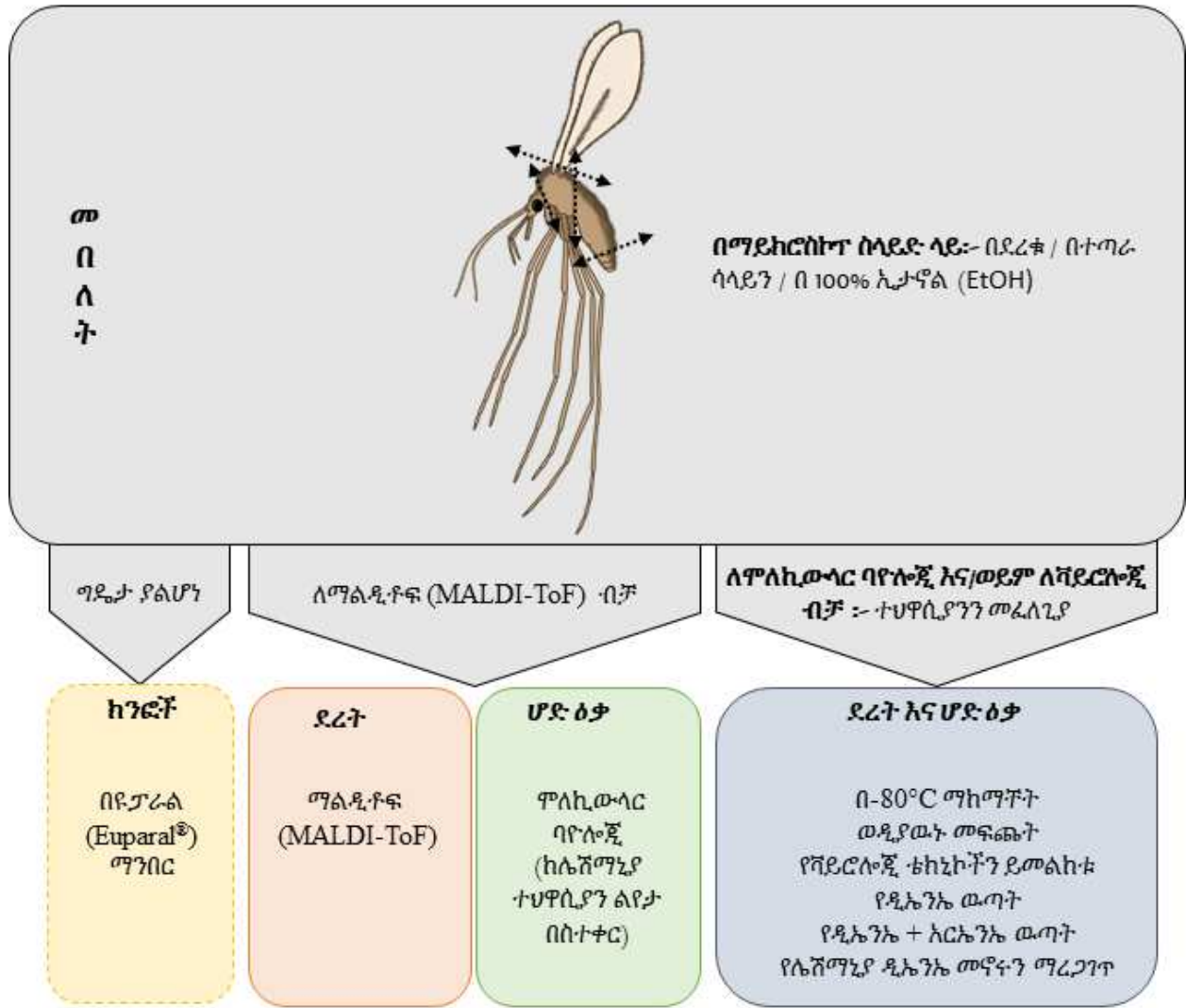


ምስል 5:- የላይሽማኒያ ተሀዋሲያን ንጠላ ዘዴ

ፕሮማስቲቲቶቹ በቀላሉ ወጥተው በብዛት እንዲራቡ (mass culture) ለማመቻቸት የሆድ ዕቃውን መክፈት [4]።

የልምምድ ጊዜ መውሰድ ተሀዋሲያንን በተሳካ ሁኔታ የመነጠል ዕድልን ይጨምራል።

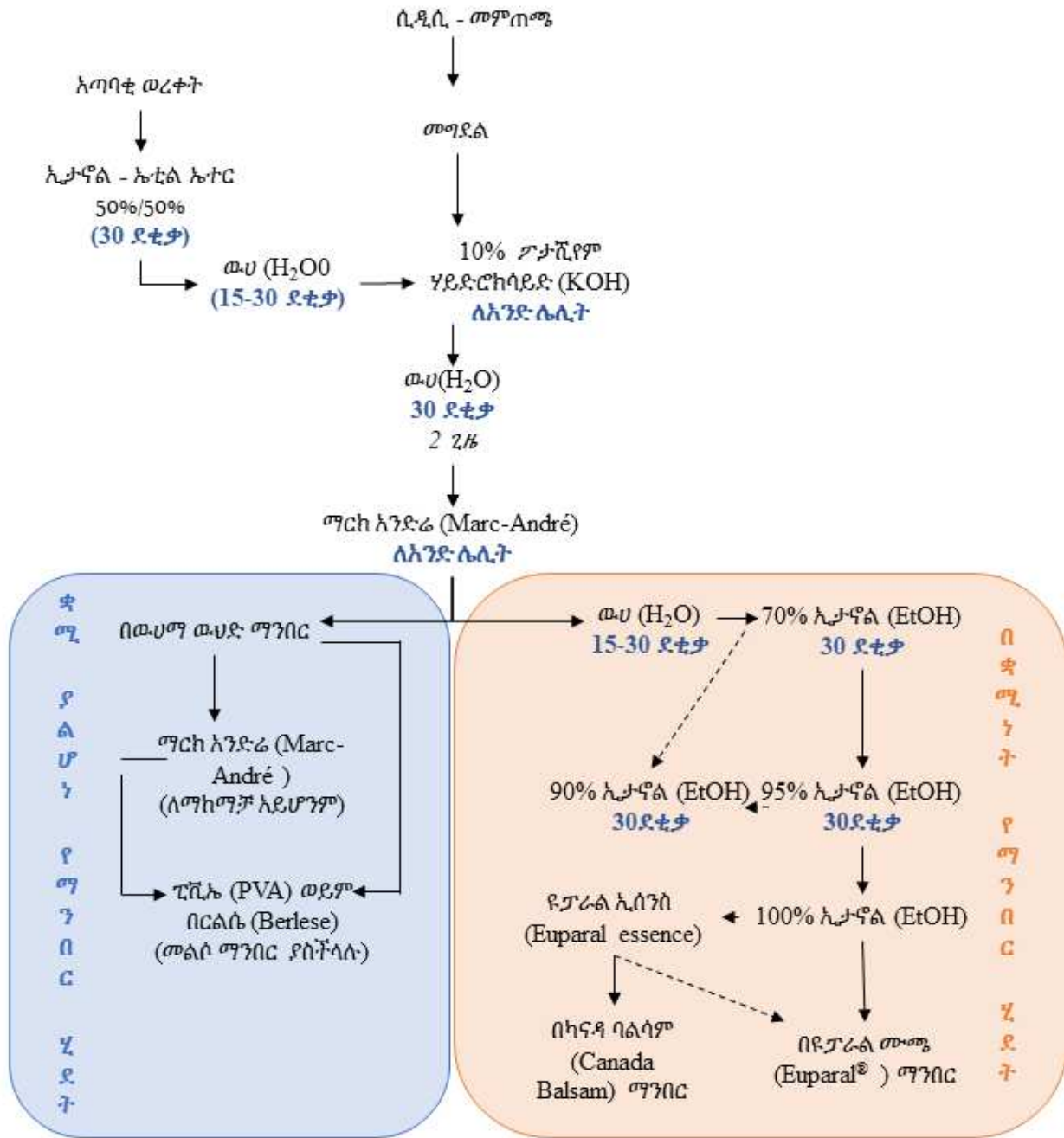
በመስክ ጥናት ላይ የላይሽማኒያ ተሀዋሲ ተሸካሚ የሆኑ አሸዋ ትንኞቶችን የማግኘት ዕድል በአንጻራዊ ሁኔታ ዝቅተኛ በመሆኑ፣ አስቀድሞ ጥሩ



ምስል 6:- የአሸዋ ትንኝን ለጥለኪውላር ባዮሎጂ፣ ለፕሮቲኦሚክስ እና/ወይም ለቫይሮሎጂ ምርመራዎች የመቀነባበር ሂደት ይህ ምስል አንዲትን አሸዋ ትንኝ ለተለያዩ የምርመራ አይነቶች እንዴት በክፍልፋይ መጠቀም እንደሚቻል ያሳያል።

በሆድ ዕቃ ውስጥ የላይሽማኒያ ጥገኛ ተህዋሲያን ከታዩ፣ ከደቂቀ ህዋስ (ማይክሮብ) በፀዱ መርፈዎች በመጠቀም ተህዋሲያኑ ከሆድ ዕቃው እንዲወጡ በማድረግ በሽፋን መስተዋቱ (coverslip) ዙሪያ የጨዋ ዉህዱ መሰስ ብሎ እንዲገባ መጨመር ያስፈልጋል። ጥገኛ ተህዋሲያኑ ወደ ጨው ዉህዱ እንዲወጡ የሆድ ዕቃው በጥንቃቄ እና በፍጥነት መቅደድ አለበት።

በ 100 µL ማይክሮ-ፒፕት ወይም በቲዩቢኩሊን (tuberculin) ሲሪንጅ በመጠቀም ጥገኛ ተህዋሲያኑን ሰብስቦ መለያ ቁጥር ወደተለጠፈለት የማሳደጊያ ዉህድ (culture medium) ውስጥ ማስገባት።



ምስል 7:- የአሸዋ ትንቅችን ለማቀነባበር የሚከናወን መደበኛ (classical) ዘዴ

የላቪማኒያ ፕሮማስቲንቶችን በብልቃጥ (in vitro) ማሳደግ:- የተነጠሉት የላቪማኒያ ተህቀሲያን መጀመሪያ በኤስ ኤን ቢያ ብለድ አጋር (SNB-9 blood agar) ወይም በኤን ኤን ኤን (NNN [Novy, Mc Neal, Nicolle]) ማሳደጊያ ውህድ ውስጥ ይቀመጣሉ[16]። እነዚህ የማሳደጊያ ውህዶች በደቂቅ ተውላክ (microbe) ባልተበከለ አልፋ ኤም ኢ ኤም (alpha-MEM) ውህድ

[16, 65] ወይም በኤም199 (M199) ውህድ ተጨምሮባቸዋል። መሆን አለበት። አንዳንድ ውህድ ከሚከተሉት ጋር መቀላቀል አለበት፡-

ሠንጠረዥ 2:- ጥቅም ላይ የሚውሉ የኬሚካል ውህዶች (Reagents) ይዘት

የውህድ ስም እና ይዘት	የውህድ ስም እና ይዘት
ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ 10% (Potassium hydroxide 10%) <ul style="list-style-type: none"> - ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ 10 ግራም - የተጣራ ውሃ እስከ 100 ሚሊ ሊትር (qs 100 mL) 	ፉክሲን አሲድ 1% በተጣራ ውሃ (Fuchsin acid 1% in distilled water) <ul style="list-style-type: none"> - አሲድ ፉክሲን (በዱቄት መልክ) 1 ግራም - የተጣራ ውሃ 99 ሚሊ ሊትር
የገም ክሎራል ማንበሪያ ዉህድ (Hoyer medium) <ul style="list-style-type: none"> - የተጣራ ውሃ 50 ሚሊ ሊትር - ክሎራል ሃይድሮግራፍ 200 ግራም - ጋም አረቢክ 50 ግራም - ግሊሰሮል 20 ሚሊ ሊትር 	በአሲድ ፉክሲን የቀለመ የማርክ-አንድሬ ዉህድ <ul style="list-style-type: none"> - የማርክ-አንድሬ ዉህድ 10 ሚሊ ሊትር - ፉክሲን 1% (50 μL)
የማርክ-አንድሬ ዉህድ (Marc-André solution) <ul style="list-style-type: none"> - ክሎራል ሃይድሮግራፍ 40 ግራም - ግሊሲያል አሴቲክ አሲድ 30 ሚሊ ሊትር - የተጣራ ውሃ 30 ሚሊ ሊትር 	የኤኔሴ ዉህድ (Enecê medium) <ul style="list-style-type: none"> - ንጹህ ነጭ ኮሎፎኒ (Pure white colophony) 22 ግራም - በአልኮል የሚሟሟ ኮፓል ጋም (Copal gum) 12 ግራም - ፍጹም ኤታኖል (Absolute ethanol) 20 ሚሊ ሊትር - ካምፎር (Camphor) 10 ግራም - ተርፔንታይን (Turpentine essence) 10 ሚሊ ሊትር - ዩካሊፕቶል (Eucalyptol) 26 ሚሊ ሊትር

10% በሙቀት የታከመ ንጹህ የፕሻ ሴረም (FCS) (የፕሻ ተህዋሲያኑን እድገት ለማፋጠን)።

1% ቢ ኤም ኢ (BME) ቪታሚኖች።

2% ንጹህ የሰው ሽንት (በ 0.2 μm ሲሪንጅ ፊልተር የጻዳ)።

250 μg/mL አሚካሲን (ወይም 50 μg/mL ጀንታማይሲን፣ ወይም የፀረ ተህዋሲ እና አሚኖ አሲድ ድብልቅ

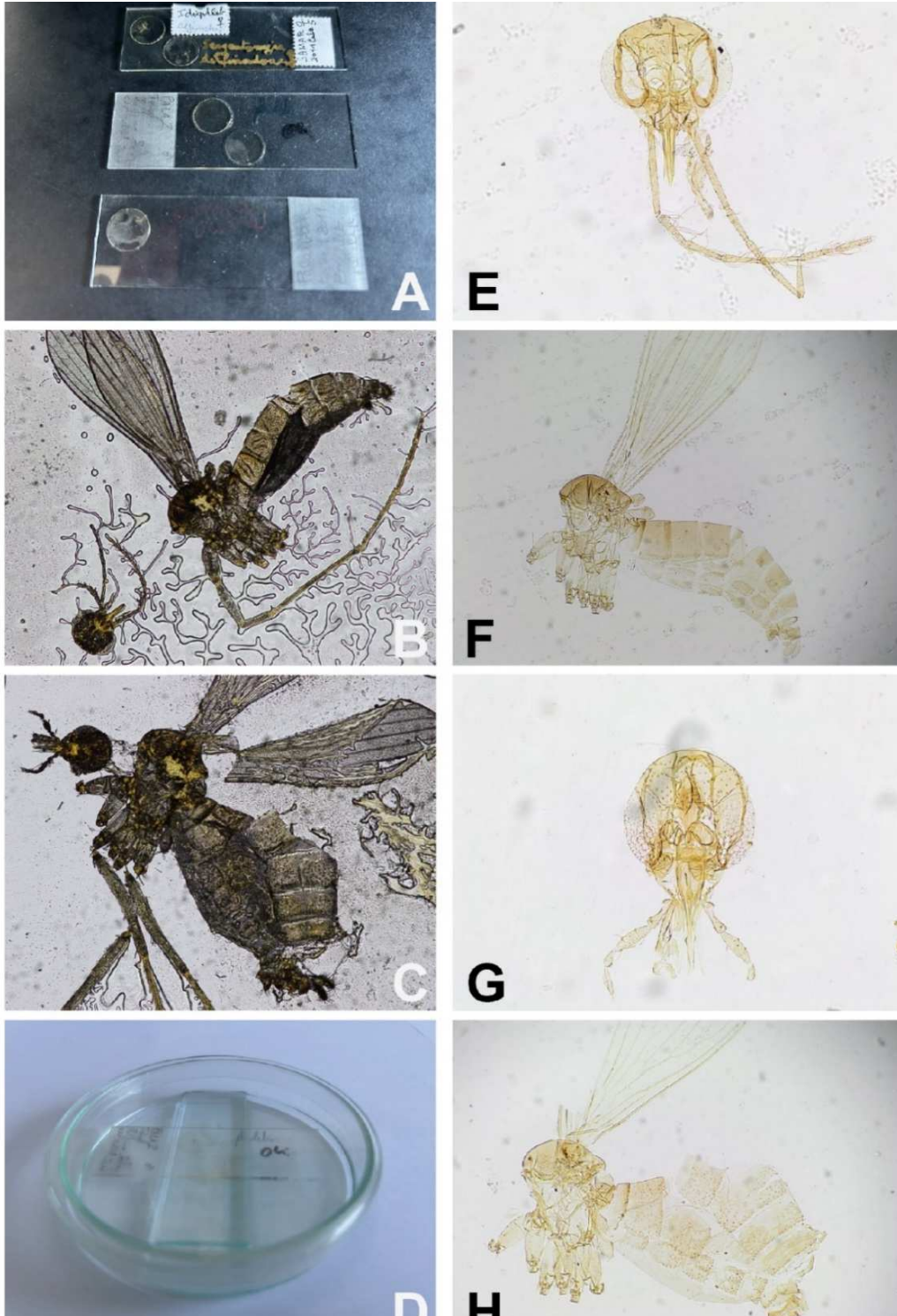
(L-glutamine 200 mM-penicillin 10 000 U-streptomycin 10 mg/mL)) [47]።

ከሦስት ቀናት በኋላ ምንም ዓይነት ብክለት (contamination) ካላጋጠመ፣ የተባዙት የላሽማይያ ተህዋሲያን (cultures) በትክክል በተዘጋጀ ማቀዝቀዣ ዉህድ ውስጥ ተደርገው ከ1 እስከ 2 ዓመት በ -80ድግሪ ሴንቲ ግራድ፣ ወይም

ለረጅም ጊዜ ለማቆየት እና ለወደፊት ምርምር በፈሳሽ ናይትሮጅን ውስጥ በ-196 ድግሪ ሴንቲ ግራድ ሊቀመጡ ይችላሉ [7]።

4.5. የምራቅ እጢዎች (Salivary glands)

የአሸዋ ትንኞችን የምራቅ እጢ መገንጠል በአሸዋ ትንኝ እና በበሽታ አምጪ ተህዋሲያን መካከል ያለውን ግንኙነት ለማጥናት መሠረታዊ ዘዴ ነው። በተለይም እንደ ፍሌቮቫይረስ (Phlebovirus - ለምሳሌ ቶስካና ቫይረስ) ያሉ በነፍሳት የሚተላለፉ ቫይረሶችን (arboviruses) ለመለየት ይረዳል [44, 75]። አሸዋ ትንኞች በጣም ጥቃቅን በመሆናቸው፣ ሂደቱ በስቴሪየ-ማይክሮስኮፕ በመታገዝ፣ በጣም ቀጭን በሆነ መቆንጠጫ ወይም በመገንጠያ መርፌዎች አማካኝነት እጢዎቹ ሳይቀደዱ ወይም ሳይበክሉ በጥንቃቄ መገንጠል አለባቸው (<https://zenodo.org/records/18302850>) [51, 61]። ለአስተማማኝ የሞለኪውላር ትንተና የእጢዎቹን ደህንነት ጠብቆ ማውጣት ወሳኝ ነው። እጢዎቹ ከወጡ በኋላ፣ ተፈጭተው (homogenized) በአር ቲ ፒሲ አር (RT-PCR)፣ ኪው ፒ ሲ አር (qPCR)፣



ምስል 8:- ስላይድን በድጋሚ ማንበር። U: በሆየር (Hoyer) ውህድ ተዘጋጅተው የተበላሹና የደረቁ ስላይዶች። ለ: የደረቀ የአሸዋ ትንኝ በማይክሮስኮፕ ሲታይ (በመድረቁ ምክንያት ዝርዝር ክፍሎቹ ግልጽ አይደሉም)። ሐ: ሌላኛው የተበላሸ የአሸዋ ትንኝ በማይክሮስኮፕ ሲታይ። መ: የደረቀውን ስላይድ መልሶ ለማርጠብ የሚያገለግል እርጥበት ያለው ሳጥን (Wet chamber)። ሠ እና ረ: ናሙና "ለ" በዩፓራል (Euparal®) በድጋሜ በማንበር የሚታይ ራስ (ሠ) እና አካል (ረ)፤ (እዚህ ጋር ምስሉ ምን ያህል ጥርት እንዳለ ማስተዋል ይቻላል)። ሰ እና ቀ: የተበላሸው ናሙና "ሐ" በዩፓራል (Euparal®) በድጋሜ በማንበር የሚታይ ራስ (ሰ) እና አካል (ቀ)።

ወይም በመድኔም ጠና (immunoassays) የቫይረስ አርኬንኤ (RNA) ወይም ምላሽ ቀስቃሽ ፕሮቲንን (Antigen) ለመለየት ምርመራ ማድረግ ይቻላል [12]። ቫይረሶች በሆድ ዕቃ ወይም በሰውነት ፈሳሽ (hemocoel) ውስጥ ብቻ ሳይሆን በምራቅ እጢዎች ውስጥ መገኘታቸው፣ በሽታ አምጪ ተሳታፊው ውጫዊ የመራቢያ ጊዜውን (extrinsic incubation period) ማጠናቀቁን እና ትንጅ ደም በምትመጥበት ጊዜ በሽታውን ማስተላለፍ እንደምትችል ያረጋግጣል [7]።

የአሸዋ ትንጅ የምራቅ እጢዎች በጣም ትንሽ ከመሆናቸው የተነሳ የመበለት ሂደቱ በቴክኒክ ረገድ ከፍተኛ ብቃትን የሚጠይቅ ሲሆን፣ ናሙናው እንዳይበላሽ ለማድረግ ትልቅ ልምድ ያስፈልጋል [1, 5]። በተጨማሪም፣ የቫይረሱ መጠን ዝቅተኛ ሊሆን ስለሚችል እንደ ኔስትድ ፒሲ አር (nested PCR) ወይም በፈጣንና በስፋት የሚከናወን የዲኤንኤ ቅደም ተከተል ትንተና (high-throughput sequencing) ያሉ በጣም ዉጤታማ (sensitive) የሆኑ የመለያ ዘዴዎችን መጠቀምን ይጠይቃል [54]። የመበከል (contamination) ተጋላጭነታቸው ደግሞ ከደቂቅ ተውሳክ ብክለት ነፃ የሚያድርጉ አጠባበቅ ዘዴዎችን መጠቀምን ይጠይቃል። ከቴክኒካዊ ችግሮች ባሻገር፣ ሥነ ህይወታዊ ሁኔታዎችም ቫይረሱን የማግኘት ስኬት ላይ ተጽዕኖ ያሳድራሉ፤ ለምሳሌ በሽታን የማስተላለፍ ብቃት (vector competence)፣ የአሸዋ ትንጅ ዝርያ እና የኢንፌክሽን መጠኑ (እንደ አካባቢያዊ እና ወቅታዊ ሁኔታዎች ይለዋወጣል) [33, 61]።

በምራቅ እጢዎች ውስጥ ቫይረሶችን መለየት ስለ በሽታው የመተላለፍ አደጋ ወሳኝ ግንዛቤን ይሰጣል፤ ይህም የታለመ የከትትል እና የቁጥጥር እርምጃዎችን ለመውሰድ ያስችላል [15]። ለምሳሌ፣ በሽታው ባለባቸው አካባቢዎች በአሸዋ ትንጅዎች ውስጥ የቶስካና ቫይረስ መገኘት ለምርመራ ፕሮቶኮሎች እና ለሕዝብ ጤና ምክሮች መነሻ ሆኗል [18]። ማጥናት በሽታው እንዳይተላለፍ ለሚረዱ ከትባቶች ወይም ሕክምናዎች አዳዲስ ግቦችን ለማግኘት ይረዳል [15, 18]።

የአሸዋ ትንጅ የምራቅ እጢዎች (Salivary glands)፣ አስተናጋጁ (Host - ለምሳሌ ሰው ወይም እንስሳ) ለትንጅ ፀረ ምራቅ ምላሽ (Anti-saliva antibody) ለመለካት እንደ ምላሽ ቀስቃሽ ፕሮቲን (Antigen) ምንጭነት ሊያገለግሉ ይችላሉ፤ ይህም በአብዛኛው ኤላይዛ (ELISA) በተባለ የኢሚዎኖሎጂ ምርመራ ዘዴ ይከናወናል። ይህ ዘዴ አስተናጋጁ እንስሳ ወይም ሰው ለአሸዋ ትንጅ ንክሻ ምን ያህል እንደተጋለጠ ለመገመት ያስችላል፤ በዚህም የተባይ መቆጣጠሪያ ዘዴዎች (Vector control) ምን ያህል ውጤታማ እንደሆኑ ለመገምገም እና የሊሽማኒያ በሽታ የመተላለፍ አደጋን (Risk) ለመለየት ይረዳል።

4.6. የደም ምግብን መለየት (Blood meal identification)

ከተያዙት ትንጅዎች መካከል ደም መጠወ ሆድ ዕቃቸው የተወጠረ (engorged) ሴቶችን አንዱ የሌላውን ናሙና እንዳይበከል (cross-contamination) የአንድ ጊዜ አገልግሎት ብቻ በሚሰጡ መሣሪያዎች መበለት ያስፈልጋል። የደም መፈጨት ደረጃውን ለመገምገም ሆድ ዕቃቸውን በስቴሪሎ-ማይክሮስፕር መመርመር ይገባል። ሆድ ዕቃቸው ቀይ፣ ቀይ-ቡናማ፣ ወይም ጥቁር ቀይ የሆኑ እና የእንቁላል መፈጠር ምልክት የማይታይባቸውን ሴቶች ብቻ መምረጥ ይመከራል። የትንጅን በአካላዊ ቅርፅ ለመለየት የሆድ ዕቃውን ጫፍ ከነ ዘር ማከማቻ ከረጢቱ (spermathecae) ላይቶ ማውጣት ያስፈልጋል። ቀሪው የሆድ ዕቃ ክፍል (ያለ ዘር ማከማቻዎቹ) በኢፕንድርፍ (Eppendorf®) ቱቦዎች ውስጥ ተደርጎ ለቀጣይ ምርመራ እስከሚፈለግ በ -20ድግሪ ሴንቲ ግሬድ መቆመጥ አለበት።

የደም ምግብ ምንጭን ለመለየት በብዛት ጥቅም ላይ የሚውሉ የሥነ ዘር መለያዎች (genetic markers) ለምሳሌ ፒ ኤን ኤሲ ቫ ሲ (PNOC) [5, 30, 50]፣ ሲ ዋይቲ CytB [67]፣ ወይም ሲጢይ (COI) [13] በስፋት የታወቁ እና በተለያዩ ጽሑፎች የተገለጹ በመሆናቸው፣ በዚህ ጽሑፍ ውስጥ በዝርዝር አይብራሩም (ምስል 6)።

በአማራጭነት፣ የደም ባለቤቱን (host) ለማወቅ የማልዲ-ቶፍ (MALDI-ToF) ህገታይድ ዝርዝር ትንተና (peptide mapping) ዘዴን መጠቀም ይቻላል [31]። ይህ ቴክኒክ ደም ከተመጠጠ በኋላ ረዘም ላለ ጊዜ የደም ምንጭን ለመለየት እንደሚያስችል በሙከራ ተረጋግጧል፤ ስለዚህ የደም መፈጨት ሂደቱ ገፍቶ ለሚታይባቸው ሴት ትንጅዎች ተመራጭ ዘዴ ነው። ናሙናዎቹ በ -20ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ወይም በ4 ድግሪ ሴንቲ ግሬድ ቢቆሙ ይመረጣል፤ ነገር ግን ናሙናዎች በተመጣጣኝ ሙቀት ውስጥ ለአጭር ጊዜ ብቻ የቆዩ ከሆነ ጥሩ ውጤት ማግኘት ይቻላል። ደም የመጠጠው ሴት ሆድ ዕቃ ከምርመራው ጥቂት ቀደም ብሎ ከቀረው አካል ተለይቶ በተጣራ (distilled) ውሃ ውስጥ መፈጨት (homogenized) አለበት። ቀሪው የአሸዋ ትንጅ አካል ለሌሎች ሞለኪውላዊ እና የአካላዊ ቅርፅ ጥናት ሊውል ይችላል። ለማልዲ-ቶፍን (MALDI-ToF) የሚሆን ናሙና መጠን ከተወሰደ በኋላ፣ ቀሪውን ክፍል የዲኤንኤ (DNA) ምርመራ በማድረግ፣ የደሙ ምንጭን ለማረጋገጥ እና/ወይም የላይሽማኒያ ተሳታፊ መኖርን ለመመርመር ሊያገለግል ይችላል። ይህ የናሙና ዝግጅት እና የትንተና ዘዴ ከዲኤንኤ ምርመራዎች ጋር ሲነጻጸር ጊዜው በጣም አጭር ነው።

5. ለአካላዊ ቅርፅ ጥናቶች ናሙናዎችን ማቀነባበር (ምስል 3፣ 6፣ 7 እና 8፣ ተጨማሪዎች 1፣ 2፣ 3 እና 4)

ይህ ክፍል አንድን የአሸዋ ትንጅ ናሙና ለአካላዊ ቅርፅ ጥናት እንዲውል አድርጎ ለማዘጋጀት እና በስላይድ ላይ ለማንበር የሚያስፈልጉትን መሠረታዊ መመሪያዎች ያብራራል፤ በመቀጠልም ከአካላዊ ቅርፅ ባለፈ ለሌሎች ምርመራዎች እንዴት ማላመድ እንደሚቻል ያሳያል። ይህንን የአሠራር ዘዴ መረዳት እጅግ አስፈላጊ ነው፤ ምክንያቱም አስፈላጊ ሆኖ ሲገኝ አሠራሩን እንደ ናሙናው ዓይነት ለማስተካከል ያስችላል።

የማቀነባበሩ ሂደት ተለዋዋጭ ፈሳሽን ለመሰብና ለማፍሰስ የሚያገለግሉ የጎማ መጭመቆያ ባላቸው የፓስተር ፒፔቶች (Pasteur pipettes) አማካኝነት ፈሳሾችን በተከታታይ የማስወጣት እና የመጨመር ተግባራትን ያካትታል። ክብ ቅርጽ ያላቸው የመስታወት መያዣዎች እነዚህን ተግባራት በእጅግ ስለሚያቀላጥፉ ተመራጭ ይሆናሉ። መስታወት ከማንኛውም ኬሚካል ጋር ምላሽ የማይሰጥ (inert) ቁስ ነው። ኬሚካሎች እንዳይተኩ ለመከላከል መያዣዎቹ ክዳን ሊኖራቸው ይገባል። እንዲሁም ክዳኑ በሚከፈት ወይም በሚዘጋበት ጊዜ ፈሳሹ እንዳይፈሰስ እና አባራ በናሙናዎቹ ላይ እንዳያርፍ መያዣዎቹን ከመጠን በላይ መመላት የለብንም። ለማጽዳት እና ለማቀነባበር የሚያስፈልጉ ኬሚካሎች በሠንጠረዥ 2 ላይ ቀርቦታል።

5.1. ማጥራት (Clearing)

የአሸዋ ትንጅ ናሙናዎች በቋሚነት በስላይድ ላይ ከማንበር በፊት፣ ተገቢውን ዘዴ እና የማጥሪያ ኬሚካል በመጠቀም (ለምሳሌ፡- 10% የአሴቲክ አሲድ (acetic acid) ወይም በብዙ አገሮች ቁጥጥር የሚደረግበትን ክሎራል ሃይድሬት (chloral hydrate) የያዘውን የማርክ-አንድሬ (Marc Andre) ወይም ብርሃን አስተላላፊ እስከሚሆን ድረስ በዝግታ እንዲሟሟ መደረግ

ሠንጠረዥ 3:- የተመረጡ ማንበሪያ ውህዶች (Mounting Media) ይዘት

ማንበሪያ ውህድ (Mounting medium)	አሟሟ ፈሳሽ (Solvent)	መከሰት የሚችሉ ፖሊመሮች (Potential polymer(s)) ወይም ፖሊመሮች (polymer)	ተጨማሪ ማብራሪያ (Remarks)
ሆየር (Hoyer) = ክሎራል ገም (chloral gum)	ግሊሰሮል (glycerol)፣ ውሃ (water)	ገም አረቢክ ውህዶች (compounds of gum arabic)	ማለስለሻ ንጥረ ነገር (Macerating agent)- ክሎራል ሃይድሬት (chloral hydrate)
ሲኤምሲፒ-9 (CMCP-9) (ከርቦክሲ ሜትል ሴሎሎስ ፊኖል (carboxy methyl cellulose phenol)	ውሃ (water) (ሲኤምሲፒ-9 (CMCP-9): 51-60%)	ሙሉ በሙሉ በውሀ ተብላልቶ የፈራረሰ ፖሊቪኒል አልኮሎል (fully hydrolyzed polyvinyl alcohol) (ሲኤምሲፒ-9 (CMCP-9): 0-5%)	ሲኤምሲፒ-9 (CMC(P)-9):- ዝቅተኛ የመወፈር ባህሪ (low viscosity); ከፍተኛ የመወፈር ባህሪ (high viscosity)
ዲኤምኤችኤፍ (DMHF) (ዲሜትል ሃይዳንቶይን ፎርማልዲሃይድ (dimethyl hydantoin formaldehyde)	ውሃ (water)	ኤን፣ኤን-ዲሜትሎል ዲሜትል ሃይዳንቶይን (N,N'-dimethylol dimethyl hydantoin (di-methylol DMH))፣ በኤተር/ሜትሊን የተሰሰሩ ኦሊጎሜሮች (Ether-/methylene-bridged oligomers)፣ የተሰሰረ የዲኤምኤች-ፎርማልዲሃይድ ፖሊመር መረብ (Crosslinked DMH-formaldehyde polymer network)	
ካናዳ ባልሳም (Canada balsam)	ሳይሊን (xylene)፣ በከፊል ተናኝ የባልሳም ክፍሎች (partly volatile components of balsam) (ዶልታ-3-ካሬን (Δ ³ -carene)፣ ሌቮፕማሪክ አሲድ (levopimaric acid)፣ ሊሞኒን (limonene)፣ ማይርሲን (myrcene)፣ ፖሎስትሪክ አሲድ (palustric acid)፣ ቤታ-ፊላንድሬን (β-phellandrene)፣ አልፋ-ፓይንን (α-pinene)፣ ቤታ-ፓይንን (β-pinene))	ባልሳም (balsam) (አቢኖል (abienol)፣ አቢቲክ አሲድ (abietic acid)፣ አይሶፕማሪክ አሲድ (isopimaric acid)፣ ሳንዳራኮፕማሪክ አሲድ (sandaracopimaric acid))	አሲድነትን ማርከስ (neutralization)- ፖታሲየም ካርቦኔት (potassium carbonate)፣ ከአቢየስ ባልሳም (Abies balsamea (Linné, 1758)) የሚገኝ ሙጫ (resin)
ዩፓራል (Euparal®)	ዩካሊፕቶል (eucalyptol)፣ ፓራልዲሃይድ (paraldehyde)፣ በከፊል ተናኝ የገም ሳንዳራክ ክፍሎች (partly volatile components of gum sandarac) (ሊሞኒን (limonene)፣ አልፋ-ፓይንን (α-pinene)፣ ቤታ-ፓይንን (β-pinene))	የገም ሳንዳራክ ውህዶች (compounds of gum sandarac) (ኮሙኒክ አሲድ (communic acid)፣ ማኖል (manool)፣ ፖሊኮሙኒክ አሲድ (polycommunic acid)፣ ሳንዳራኮፕማሪክ አሲድ (sandaracopimaric acid)፣ 12-አሴቶክሲ-ሳንዳራኮፕማሪክ አሲድ (12-acetoxy-sandaracopimaric acid)፣ ሱጂኦል (sugiol)፣ ቶሩሎሲክ አሲድ (torulosic acid)፣ ቶሩሎሶል (torulosol)፣ ቶታሮል (totarol))	ማጥሪያ ንጥረ ነገር (clearing agent)- ሜትል ሳሊሲሌት (methyl salicylate)፣ አረንጓዴማ ዩፓራል (color in Euparal® green)- የኮፐር ጫዋ (copper salt ኮፐር አቤቲኔት (copper abietinate))፣ ከቴትራክሊኒስ አርቲኩላታ (<i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl, 1791)) የሚገኝ የሳንዳራክ ሙጫ (sandarac resin)
ኤኔሲ (Enecê)	ኢቲል አልኮሎል (ethyl alcohol)፣ ከካምፎር (camphor)፣ ዩካሊፕቶል (eucalyptol) እና የተርፔንቲን ቅመም (turpentine essence) ጋር	የኮፓል ገም እና ኮሎፎኒ ሙጫ ውህዶች (compounds of copal gum and colophony (rosin))	

አለበት። የማጥራቱ ሂደት የሰውነት ህብረ ህዋሳትን፣ ስብን፣ ፈሳሾችን እና ስም መሰል ነገሮችን ያስወግዳል፤ ይህም ናሙናው ብርሃን የሚያሳልፍ (translucent) እንዲሆን በማድረግ የውጭውን አጽም (ለምሳሌ፡- የጸጉር መገጣጠሚያዎች)፣ የገጽታ ባህሪያትን (ለምሳሌ፡- ቀለማትን) እና በቆዳ ውስጥ የሚታዩ የውስጥ አካላትን (ለምሳሌ፡- የዘር ማከማቻ ከረጢትን) ለመመርመር ያስችላል።

ይህ በሁለት ደረጃዎች የሚከናወን የማጥራት ሂደት ሲሆን፣ በመጀመሪያ ጠንካራ ቤዝ (እንደ ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ [KOH] ያለ)፣ በመቀጠልም ደካማ አሲድ (እንደ ማርክ-አንድሬ [Marc Andre] ውስጥ ያለ አሲቲክ አሲድ [Acetic Acid]) መጠቀምን ያካትታል፤ ይህም የተለየ ባዮኬሚካላዊ ዓላማ አለው [74]። ቤዝ እንደ ፕሮቲን፣ ስብ እና ጠንቻ ያሉ ለስላሳ ህብረ ህዋሳትን በማሟሟት (saponification) እና በፕሮቲን ፍርስተ ቅርፅ አማካኝነት ፣ የአካለ ሽፋኑን (chitin) የውጭ አጽም መዋቅራዊ ግልጽነቱን ጠብቆ እንዲቆይ ያደርጋል። ከዚያ በኋላ የሚጨመረው ደካማ አሲድ ቀሪ የሆኑ አልካሊዎችን (ቤዞችን) በማጥፋት (neutralizing) ተጨማሪ መበስበስን ይከላከላል፤ እንዲሁም አካለ ሽፋኑን በማንጸት ዕይታዊ ጥራቱን ይጨምራል[74]። እንደአማራጭም ናሙናዎችን ለ15 ደቂቃ በተጣራ ውሃ ውስጥ ሁለት ጊዜ ማጠብ ቤዞን ለማጥፋት በቂ ሊሆን ይችላል። ይህ ተከታታይ የማጽዳት ሂደት ህብረ ህዋሳትን በማስወገድና ናሙናዎችን በጥንቃቄ በማቆየት ለአገሉ መገጠር ምርመራ ተስማሚ ያደርጋቸዋል።

ወደ ቀጣዩ ደረጃ ከመሄድዎ በፊት ናሙናዎቹን በተጣራ ውሃ

5.1.1. ለስላሳ ህብረ ህዋሳትን ማሟሽ (Soft tissue lysis) (ምስል 8)
ሲዲየም ሃይድሮክሳይድ (NaOH) ወይም ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) በብዛት ጥቅም ላይ የሚውሉ የህብረ ህዋሳት ማለስላሽ ኬሚካሎች ናቸው። እንደ ናሙናው መጠን እና በቀላሉ የመሰበር ሁኔታ፣ በተለያዩ ምጥነት (concentration) እና ለተለያዩ ቆይታ ጥቅም ላይ ይውላሉ። መደበኛው እና በጣም ውጤታማው ዘዴ አሸዋ ትንኞችን በጠንካራ ቤዝ (10% ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ [KOH] ወይም ሲዲየም ሃይድሮክሳይድ [NaOH]) ውስጥ ለአንድ ሌሊት በመዘፈቅ ለስላሳ ህብረ ህዋሳትን ማሟሟት ነው። ሂደቱ የሚወስደውን ጊዜ ለመቀነስ የኬሚካሉን መጠን መጨመር (ለምሳሌ፡- 20% ፖታስየም ሃይድሮክሳይድ [KOH] ለ6 ሰዓታት) እንዲሁም እስከ 37ድግሪ ሴንቲ ግራድ ማሞቅ ይቻላል።

5.1.2. ናሙናን በቀለም ወይም ያለ ቀለም ማጥራት (Clarification with or without staining)
ከማሟሟት ሂደት በኋላ፣ ብዙውን ጊዜ አሲቲክ አሲድ እና ክሎሪል ሃይድሬትን (ለምሳሌ፡- የማርክ-አንድሬ [Marc Andre] ወይም በሚጠቀሙ ናሙናውን የማጥራት ሥራ ይከናወናል። ከጸዳ በኋላ፣ ቀሪ ኬሚካሎችን ለማስወገድ ናሙናዎቹ ቢያንስ ለ20 ደቂቃ በሚቆዩ ሁለት ተከታታይ የውሃ መታጠቢያዎች ውስጥ በሚገባ መታጠብ አለባቸው። የማርክ-አንድሬ (Marc Andre) ወይም የአሸዋ ትንኞች ናሙናዎችን ለማዘጋጀት በስፋት ጥቅም ላይ የሚውል የማጽጃ ፈሳሽ ሲሆን ጠቀሜታዊም በቀላሉ ሊሰበሩ በሚችሉ መዋቅሮች (ለምሳሌ፡ እንደ ክንፍ እና አንቴና) ላይ ከፍተኛ ጉዳት ሳይደርስ የማጽዳት ሂደቱን ማሳሰጡ ነው። ወይንም ተዘጋጅቶ ወዲያውኑ ጥቅም ላይ ማዋል ወይም እንዳይተን በጥብቅ በተዘጋ መድኃኒት ውስጥ መቆየት አለበት። የማርክ-አንድሬ (Marc Andre) ወይም የሚጠቀሙ በተለይ የተወሰኑ የአካል ክፍሎችን በግልጽ ለማየት ከሚረዱ ቀለሞች ጋር ሲቀላቀል የበለጠ ጠቃሚ ይሆናል። የውሁዱ ይዘት እና አዘገጃጀት አባሪ 2 (Appendix 2) ላይ ተሰጥቷል። ብርሃን አሳላፊ የሆኑ (translucent) ናሙናዎችን ከማንበር በፊት በደንብ እንዲታዩ ቀለም ማቅለም ሊያስፈልግ ይችላል። ለዚህም የሚያገለግሉ

የተለያዩ ቀለማት የሚገኙ ሲሆን፣ እያንዳንዳቸው በነፍሳቱ ውስጥ ያሉ የተወሰኑ ኬሚካላዊ ክፍሎችን አላማ ያደርጋሉ። ከናሙናውም ሆነ ከተመረጠው ማንበሪያ ወይንም ጋር ሊስማማ የሚችል ቀለም መምረጥ አስፈላጊ ነው።

ይህ መሠረታዊ ዘዴ እንደ አስፈላጊነቱ ሊስተካከል ይችላል፤ ለምሳሌ 0.1% አሲድ ፉክሲንን (acid fuchsin) በማርክ-አንድሬ (Marc Andre) ወይንም ውስጥ በመጨመር ማቅለም ይቻላል።

በተጨማሪም፣ በወሃው ወይንም ተቀምጠው የነበሩ ናሙናዎችን እና ሙጫማ (resinous) ማንበሪያዎችን መጠቀም ከተፈለገ፣ የናሙናዎች እርጥበት ማስወገድ ሂደት (Dehydration) ያስፈልጋል (ክፍል 5.2 ይመልከቱ)፤ ምክንያቱም አብዛኞቹ ተፈጥሯዊ እና ሰው ሰራሽ ሙጫዎች ከውሃ ጋር አይስማሙም። ኒው [New] የተባለ (1974) ፀሀፊ እንደገለጸው፣ አንዳንድ ማቅለሚያዎች በተወሰኑ ማንበሪያ ወይንም ጋር ሲቀላቀሉ ሊበላሹ ይችላሉ [53]። ለምሳሌ በካናዳ ባልሳም (Canada balsam) ውስጥ ጥቅም ላይ የሚውለው አሲድ ፉክሲን (acid fuchsin) ይገራል (Euparal®) ውስጥም ሊቀመጥ (fixed) ይችላል። ሆኖም፣ በአሲድ ፉክሲን (acid fuchsin) የቀለሙ ናሙናዎች በቅርንፉ ዘይት ሲጣሩ ቀለማቸው የመከሰም ዝንባሌ አለው። በአጠቃላይ በቅርንፉ ዘይት ውስጥ የተቀመጡ ናሙናዎች በጥቂት ቀናት ውስጥ ቀለማቸው በከፍተኛ ሁኔታ ሊጠፋ ይችላል።

5.2. ወሀን ማስወገድ (Dehydration)

ወሀን የማስወገድ ሂደት የሚከናወነው ናሙናዎችን በቅደም ተከተል መጠናቸው እየጨመረ በሚሄድ የኤታናል (ethanol) ወይንም ውስጥ ማለትም በ50%፣ 70%፣ 80%፣ 90% ወይም 95% እና በመጨረሻም 100% ተራ በተራ እያዘዋወሩ በመዘፍዘፍ ነው ። በእያንዳንዱ መዘፍዘፍ ወሲጥ ቢያንስ ለ20 ደቂቃ መቆየት አለበት። ኤታናል (ethanol) በፍጥነት የሚተን በመሆኑ፣ በሂደቱ ወቅት የብልቃጡ ከዳን መጥበቅ አለበት። እርጥበቱ ሙሉ በሙሉ ከተወገደ በኋላ ናሙናው ለጥቂት ቀናት በዩፓራል ቅመም (Euparal® essence) ውስጥ መቆየት አለበት፤ ናሙናውን በቅርንፉ ዘይት (clove oil) ማስቀመጥ የሚቻል ቢሆንም ተመራጭ የሚሆነው Euparal® essence ነው። ቀደም ሲል ለዚህ ተግባር በስፋት ጥቅም ላይ ይውል የነበረው ቢች ከሪክሶት (Beech creosote) በመርዛማነቱ ምክንያት አሁን ሙሉ በሙሉ ታግዷል።

የእርጥበት ማስወገድ ሂደቱ (Dehydration process) በናሙናው ውስጥ ያለው ፈሳሽ ትንኚ ለማንበር ከምንጠቀምበት ወይንም (Mounting medium) ጋር ተካሄኝ መሆኑን ማረጋገጥ ያስፈልጋል። ይህ ካልሆነ ናሙናው ሊደፈርስ (Opacity)፣ በአስሞቲክ ጫና ምክንያት ሊከማተር (Osmotic collapse) ወይም ቅርጹ ሊዛባ (Distortion) ይችላል፤ ይህም የዝርያ መለያ ጥናት (Taxonomic study) ሂደቱን አዳጋች ያደርገዋል።

5.3. የማንበሪያ ወይንሞች (Mounting media)

5.3.1. ለናሙና ዝግጅት የማንበሪያ ወይንሞች መረጣና ትግበራ
የናሙና ማንበሪያ ወይንሞች የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያዎ (refractive index) በግምት 1.5 ቢሆን ይመረጣል። ይህም ከመስታዎት የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያ (refractive index) ጋር ተመጣጣኝ ያደርገዋል። የማንበሪያ ወይንሞ ቀለም የሌለው፣ ግልጽ እና ከደረቅ በኋላም ቢሆን ለረጅም ጊዜ ግልጽነቱ የማይለወጥ መሆን አለበት። ጥቅም ላይ ከሚውሉት ማቅለሚያዎች ጋር መጣጣም ያለበት ሲሆን፣ ወደ ሁሉም የናሙናው ህብረ ህዋሳት ውስጥ የመግባት እና የመሰራጨት ችሎታ ሊኖረው ይገባል። በማንበር ሂደቱ ጊዜ ወይንሞ በፍጥነት መድረቅ ወይም መደብዘዝ የለበትም። ከማንበር ሂደቱ በኋላም መኮማተር የለበትም። ተገቢውን የማንበሪያ ወይንሞ መምረጥ የናሙና ዝግጅት መሠረታዊ አካል ነው፤ ምክንያቱም ለሁሉም ዓላማ የሚሆን ብቸኛ ተስማሚ ወይንሞ የለም። ምርጫው የሚከተሉትን ቁልፍ ጉዳዮች ማመጣጠን አለበት፡-

- **የሲራዊ (Optical) ባህሪያት**:- የማንበሪያ ዉህዱ የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያ ለዝርያ መለያ ወይም ለአካል መግለጫ የሚያገለግሉ ወሳኝ የአካል ክፍሎችን በግልጽ ለማየት የሚያስችል ንፅፅር (contrast) መስጠት አለበት። እነዚህም እንደ ዘር ማከማቻ ከረጢት (spermathecae)፣ አስኮይዶች (ascoids)፣ የኒውስተድ ሴንሲላ (Newstead sensilla)፣ የምግብ መፍጫና ማስተላለፊያ ቧንቧ ቀጥተኛ ጥርሶች (vertical cibarial teeth) እና የጉሮሮ ጥርሶች (pharyngeal teeth) የመሳሰሉት ናቸው። የእነዚህ መዋቅሮች ታይነት በቀጥታ በማንበሪያ ዉህዱ ሲራዊ ባህሪያት ላይ የተመሰረተ ነው።
- **ናሙና ማቆያ (Preservation)**:- ለሙከራ አምሳያ ክምችት (Type specimen collections) የሚፈለጉ ናሙናዎች ከሆኑ፣ ዉህዱ ለረጅም ጊዜ የመቆየት እና የመረጋጋት ችሎታ ሊኖረው ይገባል። በተቃራኒው፣ ለፈጣን ቆጠራ ጥናቶች ወይም ለኤፒዲሚዮሎጂያዊ ቅኝቶች ለረጅም ጊዜ ማቆየት አስፈላጊ ካልሆነ፣ ጊዜያዊ ወይም በከፊል ዘላቂ በሆነ ማንበሪያ ዉህዶችን በመጠቀም ማቆየት ይቻላል።

5.3.2. የማንበሪያ ዉህዶችን ለመምረጥ (Mounting media) የሚያስፈልጉ መስፈርቶች

ባለሙያዎች ብዙውን ጊዜ ለተወሰኑ የምርምር ፍላጎቶች የተዘጋጁ ውስብስብ እና የተለዩ የማንበሪያ ዘዴዎችን ያዘጋጃሉ። ሆኖም፣ እነዚህ ዘዴዎች ብዙ ጊዜ እንደ የረጅም ጊዜ ማከማቻ ጥራት (archival quality)፣ ተኳኝኝነት፣ ስልጠና ማጠቃለያ (standardization)፣ የሂደቱን ምቹነትና ለረጅም ጊዜ የማቆየት ሁኔታን ግምት ወስኖ አያስገቡም። ይህ የስልጠና ምጥን መጓደል፣ የተለያዩ ናሙናዎችን በአንድ ላይ ለማቀናጀትና ለረጅም ጊዜ የሚደረገውን የክምችት እንክብካቤና አስተዳደር (Curation) ጥረት አስቸጋሪ ያደርገዋል።

ሳይንሳዊ አተገባበሮች ለማንበሪያ ዉህዶች (Mounting media) የተለዩ መስፈርቶችን ያስገድዳሉ። የዝርያ መለያ ጥናት ባለሙያዎች (Taxonomists) ብዙውን ጊዜ ሙሉውን ናሙና (Specimen) በአንድ ላይ ማንበር ይመርጣሉ፤ እንዲሁም የአካል ሽፋኑን አወቃቀር (Cuticular structures) በደንብ ለማሳየት የውስጥ አካላትን ቀስ ብሎ የሚያለሰልስ (Macerate) ፈሳሽ ይመርጣሉ። የሲራዊ ጥራትን (Optical clarity) ለማሻሻል፣ የፈሳሹ የብርሃን ስብራት መጠን (Refractive index) ከናሙናው ስብራት መጠን ጋር በቂ ልዩነት ሊኖረው ይገባል። በገበያ ላይ የሚገኙ ማንበሪያ ዉህዶች፣ ብርሃን በመስታወቱና በማንበሪያ ዉህዱ ውስጥ ሲያልፍ የሚኖረውን ነፀብራቅና ሥርጭት (Refraction and scattering) ለመቀነስ ሲባል፣ የሰብራት መጠናቸው ከመስታወት ጋር ተመሳሳይ እንዲሆን ተደርገው ይሠራሉ። ሆኖም ግን፣ በድምቀት ብርሃን ማይክሮስኮፕ (Brightfield microscopy) ምርመራ ወቅት፣ ያልቀለመ ናሙናን ተፈጥሯዊ ጎልቶ የመታየት ሁኔታ (Contrast) ለመቆጣጠር፣ የብርሃን ስብራት መጠኑ ከናሙናው ጥቂት ለየት ያለ ዉህድ ሆን ብሎ በመምረጥ ናሙናው ከሥር ጎልቶ እንዲታይ ማድረግ ይቻላል።

5.3.3. የናሙና ማንበሪያ ዉህድ ሳይንሳዊ (ሠንጠረዥ 3 እና 4)

በአገራዊ መነጻጽ ምርመራ ወቅት፣ ብርሃን በስላይድ፣ በማንበሪያ ዉህድ እና በናሙና ውስጥ እንዴት እንደሚታጠፍ ለመወሰን የማንበሪያ ዉህዱ የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያ (Refractive Index - RI) ወሳኝ ነው። የዉህዱ ነጸብራቅ መለኪያዉ ከሽፋን መስተዋቱ ነፀብራቅ መለኪያ ጋር ሲቀራረብ (≈ 1.515)፣

ብርሃን በተመጣጣኝ ሁኔታ ያልፋል፤ ይህም የብርሃን መቦታተንን እና መዛባትን በመቀነስ ጥቃቅን የናሙና አካላትን በግልጽ እንዲታዩ ያደርጋል። በአንጻሩ፣ የነጸብራቅ መለኪያዎች አለመጣጣም ምስሉ እንዲደበዘዘ (blurring) ወይም ያልቀለሙ ክፍሎች እንዲይታዩ ሊያደርግ ይችላል። ተገቢውን የእይታ ልዩነት (contrast) እና አጠቃላይ የምስል ጥራት ለማግኘት ትክክለኛውን የማንበሪያ ዉህድ መምረጥ አስፈላጊ ነው።

የአሸዋ ትንኞችን ለስላይድ ዝግጅት በሚያዘጋጁበት ጊዜ የማንበሪያ ዉህዱ ነጸብራቅ መለኪያ ጥቃቅን የናሙና አካላት በምን ያህል ጥራት እንደሚታዩ ይወስናል። ከፍተኛ የነጸብራቅ መለኪያ ያላቸው የማንበሪያ ዉህዶች ጥቅም ላይ ሲዉሉ እንደ የምግብ መፍጫና ማስተላለፊያ ቧንቧ ጥርሶች፣ የዘር ማከማቻ ከረጢት (spermathecae)፣ የአንቴና ክፍሎች እና የክንፍ ደም መላሾች ያሉ ስስ እና በቀላሉ የማይታዩ የአሸዋ ትንኝ ክፍሎችን ለማየት አስቸጋሪ ሊሆን ይችላል።

ለአሸዋ ትንኞች ማንበሪያ ዉህዶች በብዛት ጥቅም ላይ የሚውሉ አማራጮች እንደ በውሃ ሚሚ (Water-based) ማንበሪያ የሆነው ጋም-ክሎራል (Gum-chloral)፣ እና በሙጫ ሚሚ ዉህዶች (Resin-based) ማለትም ካናዳ ባልሳም (Canada balsam) እና ኢነሴ-ኔልሰን ሰርኬራ (Nelson Cerqueira -NC) ያካትታሉ። ራውሊንስ የተባለው ፀሀፊ [60] ናሙና ማንበሪያ ዉህዶችን በሁለት ይከፍላቸዋል፡- (1) ቋሚ (Permanent) ዉህዶች ሲሆኑ እነዚህ ከጊዜ ብዛት አየጠነከሩ የሚሄዱና ለረጅም ጊዜ ናሙና ማቆያ የሚመቹ ናቸው፤ (2) ከፊል-ቋሚ (Semi-permanent) ዉህዶች ደግሞ ናሙናዎች ጠንከረው የማይደርቁ ማንበሪያ ዉህዶች ፈሳሽ (Liquid)፣ ሙጫ (gum)፣ ወይም ሙጫማ (resinous) ሊሆኑ ይችላሉ፤ እንዲሁም በውሃ፣ በአልኮል ወይም በሌሎች አሚሚዎች (ለምሳሌ፡- ቶሎዊን (toluene)፣ ዛይሊን (xylene)) ሊሚሙ የሚችሉ ናቸው (ሠንጠረዥ 1)። አንዴ ጥቅም ላይ ከዋሉ በኋላ፣ በማይሚሙ የማሸጊያ ዉህዶች (ringing media) አማካኝነት ከአየር ንብረት ተጽእኖዎች ለመከላከል መታሸግ አለባቸው። የማንበሪያ ዉህድ አይነቶችን በግልጽ ለመለየት እንደሚከተለው መመደብ ይቻላል፡-

ሀ. ውሃማ ዉህዶች (Aqueous media): እነዚህ ዉህዶች በውሃ ውስጥ በቀላሉ የሚሚሙ በመሆናቸው ለጊዜያዊ ወይም ለከፊል-ቋሚ ማንበሪያ ያገለግላሉ። አጠቃቀማቸው ቀላል ቢሆንም፣ በተለይም እርጥበት አዘል በሆኑ ሞቃታማ አካባቢዎች፣ ለአየር እርጥበት እንዳይጋለጡ ማሸግ (sealing) ያስፈልጋል። (ለምሳሌ፡- ገም ክሎራል (gum-chloral) እና ፖሊቪኒል አልኮል (polyvinyl alcohol)።

ለ. ውስን የውሃ መቋቋም አቅም ያላቸው ዉህዶች (Limited water-tolerant media): እነዚህ ፈሳሾች በውሃ የመነፃፃት ዕድላቸው አነስተኛ ቢሆንም እንኳን ከፍተኛ እርጥበት ካለው አካባቢ ማራቅ ያስፈልጋል። በውሃ ውስጥ ከሚሚሙት ዉህዶች ጋር ሲነጻጸሩ የተሻለ የረጅም ጊዜ መረጋጋት ችሎታ ያላቸው ሲሆን፣ በብዛት ለከፊል-ቋሚ ማንበሪያዎች ያገለግላሉ።

ሐ. በሃይድሮካርቦን የሚሚሙ ዉህዶች (Hydrocarbon-soluble media): እነዚህ ዉህዶች እንደ ዛይሊን፣ ቶሎዊን፣ ወይም ኤኔሴ (enecé solvent) ባሉ ተፈጥሯዊ አሚሚዎች ውስጥ የሚሚሙ ናቸው። እነዚህ ለቋሚ ማንበሪያ የተዘጋጁ እና እጅግ በጣም ጥሩ የረጅም ጊዜ መረጋጋት የሚሰጡ ናቸው። እርጥበትን ስለሚቋቋሙ እና ይዘታቸውን ሳይቀይሩ የመቆየት ብቃት ስላላቸው ለረጅም ዘመን ማቆያ (archival) ዓላማዎች ተመራጭ ናቸው (ለምሳሌ፡- ኒውትሮል ካናዳ ባልሳም፡ ዲፒኤክስ (neutral Canada balsam፡ DPX)።

በአጠቃላይ ከላይ የተዘረዘሩት ሦስት የናሙና ማንበሪያ ዉህዶች ባህሪያትና ጥቅም አእንደሚከተለው መግለፅ ይቻላል፤

- በውሃ የሚሟሙ (Water-soluble) ወይም በቀላሉ መልሶ ለማውጣት በጊዜያዊነት ለማንበር ወይም በቀላሉ መልሶ ለማውጣት
- ውስን ውሃ የመቋቋም ችሎታ ያላቸው ወይም (Limited water-tolerant) ናሙናን ላልተራዘመ ጊዜ ለማቆየት ከፊል-ቋሚ (Semi-permanent) ማንበርያነት።
- በሃይድሮካርቦን የሚሟሙ (Hydrocarbon-soluble) ወይም ናሙናን ለታሪክ ተመዝግቦ ለሚቀመጡ (Archival) እና ለረጅም ዘመን ቋሚ ማንበርያነት።

5.3.4. ተመራጭ የሆኑ ማንበሪያ ወይም መግለጫ (ሰንጠረዥ 3 እና 4)

ለጊዜያዊ ምልክታ የሚያገለግሉ ወይም

ክሎራል ገም (Chloral gum) = የሆየር (Hoyer) ፈሳሽ/ወይድ (RI = 1.48) የማርክ-አንድሬ (Marc André) ፈሳሽ የዘር ማከማቻ ከረጢቶችን (spermathecae) ለጥቂት ሰዓታት (ስላይዱ እርጥበት ባለው ክፍል ውስጥ ከተቀመጠ ለተወሰኑ ተጨማሪ ሰዓታት) ለማየት፣ ፎቶግራፍ ለማንሳት (ምስል 4) ወይም ለመሳል ምርጡ ወይድ ነው። የዘር ማከማቻ ከረጢቶችን ፣ ለመክከለኛ ጊዜ ለማቆየት በውሃማ (aqueous) ወይድ ውስጥ በድጋሚ ማንበር ያስፈልጋል። በሙጫ (resin) ውስጥ ለማንበር ሲባል ናሙናዎቹን ማድረቅ (dehydration) የሚቻል ቢሆንም፣ ናሙናው ሊጠፋ ስለሚችል አይመከርም።

ክሎራል ገም እና የሆየር ፈሳሽ ተመሳሳይ ስያሜዎች ናቸው። ይህ ወይድ ከውሃ ጋር ስለሚሰማማ፣ ለቀላል እና ፈጣን ትግበራ አመቺ በመሆኑ እንዲሁም እንደ ዘር ማከማቻ ከረጢት ያሉ ስስ የአካል ክፍሎችን ለመመልከት በሚረዳው የብርሃን ስብራት አመልካች (refractive index) ምክንያት ለውስጥ አካላት ምልክታ በስፋት ጥቅም ላይ ይውላል። ሆኖም፣ ክሎራል ገም በአግባቡ ካልተዘጋጀ ወይም ተስማሚ በሆነ እርጥበት ውስጥ ካልተቀመጠ ጉልህ ድክመቶች ያስከትላል። እነዚህም ጥርኝ መፍጠር (Crystallization)፣ ቀለም መቀየር እና የመለጠጥ ባህሪን ማጣት ናቸው። የሽፋን መስተዋቱን (coverslip) ጠርዝ በሙጫ ማሰር (ringing) እነዚህን ችግሮች አይፈታቸውም፤ ምክንያቱም የማንበሪያ ወይዱ ከማሰሪያው ሙጫ ጋር (በተለይም ዩፓራል® ጥቅም ላይ ከዋለ) በሚፈጥረው ግንኙነት ምክንያት ቀለሙ ሊለወጥ (አንዳንዴም ወደ ጥቁርነት ሊቀየር) ይችላል።

የሆየር ወይድ ለአሸዋ ትንኞች በአጥቲካል እይታ ረገድ ምርጡ ተደርጎ ይወሰዳል። በተለምዶም ለነዚህ ዓላማዎች ጥቅም ላይ ውሏል። ወይዱ እንደ ገም አረቢክ፣ ግሊሰርል እና ክሎራል ሃይድሬት ያሉ ተቀራራቢ ወይዶችን ይይዛል። የወይዱ አዘገጃጀት ቀመሩ በተሳሳተ መንገድ ሲተረጎምና ሲጠቀስ ቆይቷል[74]።

ምንም እንኳን ሆየር በአሸዋ ትንኞች ውስጥ የዘር ማከማቻ ከረጢትን ለማየት ጥሩ ቢሆንም፣ ለረጅም ጊዜ ማቆያነት ግን ተስማሚ አይደለም። ለፎቶግራፍ፣ ለሥዕል ወይም ለምስል ቀረጻ ለሚደረጉ የአጭር ጊዜ ምልክታዎች ተመራጭ ነው። ውሃማ ወይዶች ለጊዜያዊ ማንበሪያ ተስማሚ ቢሆኑም የረጅም ጊዜ ማቆያነት ተስማሚ ላይሆኑ ይችላሉ። በተቃራኒው፣ በሙጫ (resin) ማንበር ለዘመናት የሚቆይ እጅግ በጣም ጥሩ ጥንካሬ ይሰጣል፤ ነገር ግን የዘር ማከማቻ ከረጢቶች ረቂቅ አካላት የብርሃን ነጸብራቃቸው (refringence) ብዙ ጊዜ ስለሚጠፋ እይታቸው ሊያደበዝዝ ይችላል።

የሆየር ወይድ በድርቅት (dehydration) ምክንያት በጊዜ ሂደት ይበላሻል (ምስል 8)፤ ይህም ትናንሽ ነጭ እና ብርሃን የማያሳልፉ የክሎራል ሃይድሬት ጥርኞች እንዲፈጠሩ ያደርጋል። ቢሆንም፣ የነፍሳቱ አካል ሽፋን (cuticle) በኬሚካል ሳይንዳ ስለሚቆይ ናሙናዎቹን ከተበላሹ ስላይዶች ላይ መልሶ ማውጣት ይቻላል፤ ነገር ግን ጥርኞቹ እያድጉ ሲሄዱ በነፍሳቱ ላይ አካላዊ ጉዳት ሊያደርሱ ይችላሉ።

በስላይድ ላይ የጥርኝ መፈጠር (Crystallization) ችግር ሲያጋጥም ናሙናውን ለማዳን ሁለት ዋና አማራጮችን መጠቀም ይቻላል። የመጀመሪያው ዘዴ የማንበሪያ ወይዱን ሙቀትና እርጥበት ባለው አካባቢ ውስጥ በማቆየት መልሶ ማርጠብ ሲሆን፣ በዚህ ሂደት ወቅት በእርጥበቱ ምክንያት የፈንገስ እድገት እንዳይከሰት ለመከላከል ታይሞል (Thymol) የተባል ኬሚካል መጠቀም አስፈላጊ ነው። ሁለተኛው ደብልጥ አስተማማኝ የሆነው አማራጭ ደግሞ ናሙናውን ከደረቀው የገም ክሎራል ውሃድ ውስጥ በውሃ ዘፍዝፎ በጥንቃቄ ማውጣት፣ ከዚያም በግላሺያል አሴቲክ አሲድ አማካኝነት በውስጡ ያለውን ውሃ ማስወገድና በመጨረሻም በካናዳ ባልሳም ላይ መልሶ ማንበር ነው።

ዲ ኤም ኤች ኤፍ (DMHF [dimethyl hydantoin formaldehyde]) (RI 1.48)

ይህ ወይድ ወይድ [72] እንደ በርሌዝ (Berlese) ሁሉ በሲራዊ እይታ ረገድ በጣም ጥሩ እና ለመጠቀም ቀላል ነው። ሆኖም ከበርሌዝ በተለየ ወደ ጥቁርነት አይቀየርም ወይም ጥርኝ አይሰራም። ለአሸዋ ትንኞች እና ለሌሎች ሳይኮሎጂዳይ (Psychodidae) ዝርያዎች በሚገባ ያገለግላል።

ሲ ኤም ሲ ፒ (CMCP [camphor-mono-chlorophenol]) (RI = 1.41)

ይህ በግሊሰሪን ላይ የተመሰረተ እና በውሃ ውስጥ የሚሟሟ የማንበሪያ ወይድ ሲሆን፣ ብርሃን የሚያሳልፉ ቋሚ የሆኑ የአሸዋ ትንኞች እና ሌሎች ስስ ናሙናዎችን በስላይድ ላይ ለማንበር ያገለግላል። የዚህ ወይድ ጥቅሙ ናሙናዎችን በቀጥታ ከውሃ ወይም ከኤታሎል ውስጥ ወስዶ ማንበር ማስቻሉ ነው። የአሸዋ ትንኞችን በፍጥነት በማፍታታት ያጠራል፤ የአሸዋ ትንኞችን የአካል ሽፋን በማለስሰል ናሙናው በትክክል እንዲቀመጥ ያደርጋል፤ ይህም በተለይ ከንፎችን ለመዘርጋት ወይም የመራቢያ አካላትን ለመበለት ጠቃሚ ነው። ለረጅም ጊዜ ማቆያ እንደሚረዳ ቢገለጽም፣ በትክክል ለምን ያህል ጊዜ እንደሚቆይ ግን እርግጠኛ መሆን አይቻልም። የዚህ ወይድ ዋና ችግሩ ፊኖል (phenol) የተባል መርዛማ እና የሚቆጠቁጥ ንጥረ ነገር የያዘ በመሆኑ ጥንቃቄ የተሞላበት አያያዝን የሚጠይቅ መሆኑ ነው።

ለቋሚ ናሙና ማንበሪያነት የሚያገለግሉ ወይም

ካናዳ ባልሳም (Canada balsam) (RI = 1.52-1.54)

ለመጀመሪያ ጊዜ ለማይክሮስኮፕ ምርምር ተስማሚ መሆኑ ተለይቶ የታወቀው በ1830ዎቹ በአንድራው ፕሪትቻርድ አማካኝነት ነበር። ይህ ወይድ ከአንድ መቶ አምሳ ዓመታት በላይ ለተሳካ አገልግሎት በመዋሉ እና ለረጅም ዘመን የመቆየት (Archival) ብቃቱ ስለተረጋገጠ ዛሬም ድረስ በሰፊው ጥቅም ላይ ከሚውሉ ወይዶች መካከል አንዱ ነው። ከሆየር ወይድ በተለየ፣ ካናዳ ባልሳም በጊዜ ሂደት ጥርኝ (ክሪስታል) አይሰራም ወይም እርጥበትን ወደ ውስጥ አይመጥም። ይሁን እንጂ ውሃዱ ከፍተኛ የሆነ የተፈጥሮ ብርሃን የማንጸባረቅ (Autofluorescent) ባህሪ ስላለው ለአንዳንድ የማይክሮስኮፕ ምርመራ ዘዴዎች እንደ ጉድለት ሊታይ ይችላል። በተጨማሪም ዝግጅቱን በምናከናወንበት ወቅት ከዛይሊን ይልቅ መርዛማ ያልሆኑ አሟሚዎችን በመጠቀም የደህንነት ስጋትን መቀነስ ቢቻልም፣ ይህ ደግሞ የራሱ የሆኑ ጉዳቶች ሊኖሩት ይችላል (ለምሳሌ ቀስ ብሎ መድረቅ እና የውሃዱ መጥቆር)።

ዩፓራል® (Euparal®) (RI = 1.48)

ዩፓራል (የብርሃን ስብራት መጠን = 1.48) ለረጅም ጊዜ ለሚቆይ ቋሚ ስላይድ ዝግጅት እንደ ካናዳ ባልሳም በሰፊው ጥቅም ላይ የሚውል ሲሆን፣ እጅግ በጣም ጥሩ የሆነ የመቆየት አቅም እና ለምርመራ ተስማሚ የሆነ የብርሃን ስብራት መጠን አለው። ዩፓራል ሁለት ዋና ዋና ባህሪያት አሉት፤

አንደኛው የውሃ ማስወገድ (Dehydration) አስፈላጊነት ሲሆን፣ ናሙናው ወደ ውሃዱ ከመሸጋገሩ በፊት ብዙውን ጊዜ ከ95% እስከ 100% (Absolute) በሆነ አልኮል ውስጥ እንዲቆይ በማድረግ በውስጡ ያለውን ውሃ ማስወገድ የግድ ይላል

ሁለተኛው ባህሪው ደግሞ የሂደቱ መርዘም ነው፤ እንደ ካናዳ ባልሳም ወይም ዩፓራል ያሉ የሙጫ ውህዶችን መጠቀም የውሃ ማስወገድ ደረጃን ስለሚጠይቅ አጠቃላይ የናሙና ዝግጅት ጊዜውን ያራዝመዋል። ናሙናዎችን በተፈጥሮዊ አሟሚዎች ማድረቅ በማይቻልበት ሁኔታ ውስጥ፣ ከወሀ ነፃ የሆነ አልኮል (Absolute ethanol) ወይም የውጤት ናሙናዎችን ወደ መጨረሻው ማንበሪያ ወህድ ከመውሰዳቸው በፊት እኩል መጠን ባለው የዩፓራል እና የዩፓራል ኤሰንስ (Euparal essence) ድብልቅ በተሰራ ወህድ ውስጥ ማቆየት ያስፈልጋል።

ኤነሴ [Enecel] (የብርሃን ስብራት መጠን = 1.467)

ኤነሴ በሙጫ ላይ የተመሰረተና በዋናነት ለጥቃቅን ነፍሳት ዝግጅት የሚያገለግል ውህድ ሲሆን፣ በተለይም በብራዚል ውስጥ ከፍተኛ ተወዳጅነት አለው። የውሃዱ መሠረት በአልኮል፣ በካምፎር፣ በተርፔንታይን ኤሰንስ (Essence of turpentine) እና በዩካሊፕቶል ውስጥ የሟሟ ኮሎሬኒ እና የኮፓል ሙጫ (Gum copal) ነው። ሰርኬራ(Cerqueira)[11] የተባለ ተመራማሪ ኤነሴን ለነፍሳት ዕጭ (Larvae)፣ ለነፍሳት ውጫዊ ሽፋን (Exuvia) እና ለአዋቂ ትንኞች ቋሚ ስላይያ ዝግጅት እንደ ካናዳ ባልሳም አማራጭ አድርጎ የገለጸው ሲሆን፣ ከዚያ ጊዜ ጀምሮ ለአሸዋ ትንኞችም በሰፊው ጥቅም ላይ እየዋለ ይገኛል። ኤነሴ ለቋሚ ናሙና ዝግጅት አነስተኛ ወጪ የሚጠይቅ አማራጭ ሲሆን፣ ናሙናዎችን ርጉዕ የማድረግ እና ለረጅም ጊዜ የማቆየት ብቃት አለው። በተጨማሪም በቂ የመድረቂያ ጊዜ ስለሚሰጥ ናሙናዎችን በጥንቃቄ ለመበለት እና የአካል ክፍሎችን በቅደም ተከተል ለማስተካከል ያስችላል።

5.4. የሰላይድ ዝግጅት እና ማድረቅ

የተዘጋጁ ሰላይዶች ለረጅም ጊዜ ሳይበላሹ እንዲቆዩ ትክክለኛ የማድረቅ ሂደት መከተል አስፈላጊ ነው። ሰላይዶችን ለረጅም ጊዜ ከምችት ከማስቀመጥ በፊት ሙሉ በሙሉ መድረቃቸውን ማረጋገጥ ያስፈልጋል። ለተሻለ ውጤት፣ በቋሚ የማንበሪያ ውህዶች (Permanent media) የተሰሩ ሰላይዶች ከ2 እስከ 3 ሳምንታት፣ በከፊል-ቋሚ (Semi-permanent) የተሰሩት ደግሞ ከ1 እስከ 2 ሳምንታት በአግድም (Horizontally) ተቀምጠው መድረቅ አለባቸው። የማድረቅ ሂደቱ ውጤታማ እንዲሆን እንደ ውሃዱ ባህሪ ተገቢው የሙቀት መጠን ያለው ኢንኩቤተር (Incubator) መጠቀም የሚመከር ሲሆን፣ ናሙናውን ሊጎዳ የሚችል ከፍተኛ ሙቀትን ማስወገድ ያስፈልጋል። ለዚህም ከ30°C እስከ 37°C ያለው የሙቀት መጠን ተመራጭ ነው። ይህ የማድረቅ ደረጃ ናሙናው እንዳይጣመምና እንዳይበላሽ ወይም በማከማቻ ጊዜ ውሃዱ እንዳይቀጥን ለመከላከል ወሳኝ ነው።

በሰላይድ ዝግጅት ወቅት ጥቅም ላይ የዋለው የማንበሪያ ውህድ ሁልጊዜ በሰላይዱ መለጠፊያ (Label) ላይ መጥቀስ አለበት። ከተቻለ የተጠቀሙበትን ልዩ የውህድ ቀመር (Recipe)፣ የዝግጅቱን ቀን እና ያዘጋጀውን ሰው ስም ማካተት ይገባል። መጀመሪያ ላይ ሰላይዶች ለጊዜያዊ አገልግሎት ብቻ ተዘጋጅተው ሊሆን ይችላል፤ ነገር ግን የናሙናው ሁኔታ ተቀይሮ ለምሳሌ የሙከራ አምሳያ ቅደም ተከተል (Type series) ለዝርያ ምደባ ጥናት በቋሚነት እንዲቀመጥ ከተፈለገ፣ ናሙናው ለወደፊት ምርምር እንዲቆይ ይበልጥ ቋሚ የሆኑ የማንበሪያ ውህዶችን መጠቀም ያስፈልጋል።

5.5. አማራጭ የናሙና ማንበሪያ ቴክኒኮች፡- በካርድ ላይ ማንበር (Card mounting)

በካርድ ላይ ናሙናዎች ማንበር በቀጥታ በነፍሳት መያዣ ካርዶች ላይ በሚሰማር የሚሰኩበት ወይም በሙጫ የሚለጠፉበት ማንበሪያ ዘዴ ነው። ይህ ዘዴ ለበርካታ ነፍሳት ዝርያዎች ማንበሪያነት የሚያገለግል ሲሆን፣ አሸዋ ትንኞች ግን በጣም ትናንሽ በመሆናቸው እና ዝርያቸውን ለመለየት የውስጥ አካላትን በማጥራት (አባሪ 5ን ይመልከቱ) ማየት ስለሚያስፈልግ፣ ይህ ዘዴ ለአሸዋ ትንኞች በፍጹም ተስማሚ አይደለም።

5.6. የተጎዱ ናሙናዎችን መልሶ ማንበር (Remounting)

ብርቅዬ ወይም ውድ የሆኑና የተጎዱ ናሙናዎችን ለማንበር የሚከተለውን ባለ ሁለት ደረጃ ዘዴ መጠቀም ይመከራል፡-

1. ሳይበታተኑ መልሶ ማርጠብ (Rehydration)፡- ናሙናውን ከመበተንም በፊት ለመጀመሪያ ምልከታ እንዲያመች መልሶ ማርጠብ ያስፈልጋል። ለዚህም የሰላይድ መያዣን በፔትሪ ዲሽ (Petri dish) ውስጥ በማስቀመጥ ስላይዱን በላዩ ላይ መደርደር። በመቀጠል በፔትሪ ዲሽ ውስጥ ጥቂት ሚሊሜትር የሚሆን አሟሚ ፈሳሽ (Solvent) መጨመር፤ በዚህ ጊዜ ስላይዱ ከፈሳሹ ጋር በቀጥታ እንዳይነካካ ጥንቃቄ ማድረግ ያስፈልጋል (ምስል 8 D)። ይህ ሂደት እርጥበት ያለው ክፍል (Humid chamber) ይፈጥራል። ናሙናው እንዲርጥብ የሚያስፈልገው ጊዜ እንደ ሁኔታው ከአንድ እስከ ብዙ ቀናት ሊፈጅ ስለሚችል ሂደቱን በየቀኑ በትዕግስት መከታተል ያስፈልጋል። ስላይዱ በቂ እርጥበት ካገኘ በኋላ፣ ከእርጥበት ክፍሉ አውጥቶ ለማይክሮስኮፕ ምርመራ፣ ለፎቶግራፍ ወይም ለስዕል እንዲያመች ለጥቂት ሰዓታት በኢንኩቤተር ውስጥ ማቆየት ይቻላል።

2. መልሶ ማንበር (Remounting)፡- ናሙናውን ከአራጌው ስላይድ ላይ አንስቶ በአዲስ ለማንበር፣ ስላይዱን ለተጨማሪ ጥቂት ሰዓታት ወይም ለአንድ ሙሉ ሌሊት በእርጥበት ክፍሉ ውስጥ መልሶ ማቆየት ያስፈልጋል። አራጌውን ስላይድ የመበተኑ ሂደት ባለ ሁለት ዓይን አጉሊ መነፀርን (Binocular microscope) በመጠቀም መከናወን አለበት። በጥቃቅን መርፈኞች በመታገዝ የሽፋን መስታወቱን (Coverslip) ማንሳት ያስፈልጋል። በዚህም ጊዜ የትንጅ አካላት ከመስታወቱ ጋር ተጣብቀው እንዳይቀሩ ከፍተኛ ጥንቃቄ ማድረግ ያስፈልጋል (<https://zenodo.org/records/18315029>)።

ወንጠረዥ 4:- የተመረጡ የማንበሪያ ዉህዶች ጠቀሜታዎች እና ጉድለቶች (በተለያዩ ባለሙያዎች ያልታተሙ ምልክታዎችን ጨምሮ [52])

ስም (Name)	ጠቀሜታዎች (Advantages)	ጉድለቶች (Disadvantages)
ካናዳ ባልሳም (Canada balsam)	የማንበሪያ ዉህዱ እጅግ ዘላቂ (durable) ስለሆነ ዕድሜውም ከ150 ዓመታት በላይ ሊቆይ ይችላል። ስላይዶች በቅርንፉድ ዘይት (clove oil) ወይም በፌኖል (phenol) እንደ መጫኛ ንጥረ ነገሮች (mounting agents) በመጠቀም ሊጫኑ ይችላሉ።	ጎጂ የሆኑ ይዘቶች ስላለው ጥንቃቄ በሚፈልግ ማሽን (hood) ዉስጥ መያዝ አለበት። በኤታኖል (Ethanol) ውሃን በማስወገድ ወደ ዛይሊን (xylene) ወይም ቅርንፉድ ዘይት (clove oil) ማዛወር እንዳንድ ዝርያዎችን (taxa) ተሰባባሪ (brittle) ሊያደርጋቸው ይችላል፤ አማራጮችን (ለምሳሌ፡- አይሶፕሮፓኖል (isopropanol)፣ ኤን-ቡታኖል (n-butanol)፣ ሴሎሶልቭ (Cellosolve™)፣ 1,4-ዳዮክሰን (1,4-dioxane)፣ ሂስቶክሊየር (Histoclear)፣ ተርፒንዮል (terpineol)) መጠቀም መሰባሰብን ሊቀንስ ይችላል። ዛይሊን (xylene) በፌኖል (phenol) ከተተካ ወይም የፖታሺየም ሃይድሮክሳይድ (potassium hydroxide) ቅሪት ካለ ናሙናዎቹ ሊጠቁሩ (blacken) ይችላሉ። ያልተቀለሙ (unstained) የናሙና ቅርጾች በከፍተኛ የብርሃን ነጸብራቅ ምክንያት አካለ ቅርፃቸው ሊደበዘዘ ወይም ሊሸፈን ይችላል። ያለ ማድረቂያ ማሽን (የማንበሪያ ዉህዱ እጅግ ዘላቂ (durable) ስለሆነ ዕድሜውም ከ150 ዓመታት በላይ ሊቆይ ይችላል። ስላይዶች በቅርንፉድ ዘይት (clove oil) ወይም በፌኖል (phenol) እንደ መጫኛ ንጥረ ነገሮች (mounting agents) በመጠቀም ሊጫኑ ይችላሉ። hot-plate) ሙሉ በሙሉ ለማድረቅ ዓመታትን ሊወስድ ይችላል። ማንበሪያ ዉህዱ (medium) በጊዜ ሂደት ወደ ቢጫነት ይለወጣል እንዲሁም ይጨልማል፤ በተለይ በቅርንፉድ ዘይት (clove oil) ሲጸዳ ይህ በከፍተኛ ሁኔታ ይታያል። ማንበሪያ ዉህዱ በራሱ ጊዜ አሲዳማ (acidic) ሊሆን ስለሚችል፣ አንዳንድ ቀለሞች እንዲዳከሙ እና ካቲዮኒክ ቀለሞች (cationic dyes) እንዲደበዘዙ ሊያደርግ ይችላል።
DMHF (ዲሜቲል ሃይዳንቶይን ፎርማሊዳይድ - dimethyl hydantoin formaldehyde)	ከፍተኛ የብርሃን አስተላላፊነት (High transparency) ጥሩ የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያ (Good refractive index) የቅርጾች ታይነት እጅግ በጣም ጥሩ ነው (Excellent visibility of structures) የናሙና ዝግጅቶች መረጋጋት ወይም ጥንካሬ በጥሩ ሁኔታ ላይ ነው (Fairly good stability of the preparations) ከብዙ ማቅለሚያ ዘዴዎች (staining techniques) ጋር ይጣጣማል ለናሙናዎች (samples) ተስማሚ ማቆያ ነው በስላይድ (slide) እና በመሸፈኛ መስተዋቱ (coverslip) መካከል ጥሩ መጣበቅ (adhesion) ይፈጥራል	በጊዜ ሂደት ወደ ቢጫነት የመቀየር ዕድል አለው (Possible yellowing over time) አንዳንድ ማቅለሚያዎችን (stains) ሊቀይሩ ይችላል ፎርማሊዳይድን ለማይቁቁሙ (formaldehyde-sensitive) ማቅለሚያዎች ተስማሚ አይደለም የአየር አረፋዎች (Air bubbles) መፈጠር እና የማድረቂያ ጊዜው የዘገየ መሆን (slow drying time) ማንበሪያ ዉህዱ (Mounting medium) እርጥበትን (humidity) መቆቆም አይችልም አንዴ ከተነበረ በኋላ መልሶ ማውጣት ወይም ማስተካከል (reverse) አስቸጋሪ ነው ፎርማሊዳይድ (Formaldehyde) መርዛማ (toxic)፣ የሚቆጠቁጥ (irritant) እና ለካንሰር የሚያጋልጥ (carcinogenic) ነው
ኤውፓራል (Euparal - transparent)	ከ50 ዓመታት በላይ የሚቆይ ዘላቂ (durable) ዉህድ ነው። በአምራች ተቋማት በተገለፀው መመሪያ መሰረት ቀጥታ ከ80% ኤታኖል ላይ ማንበር ይቻላል። ያልተቀቡ ቅርጾችን አይሸፍንም፤ በጊዜ ሂደት አይሰባባሩም (brittle) ወይም ወደ ቢጫነት አይቀየሩም። ለዝንቦች (Diptera) ምርመራ ከካናዳ ባልሳም የተሻለ የብርሃን ነጸብራቅ አለው። ወፈር ያሉ ናሙናዎችን ለማንበር ተስማሚ ነው። ምክን ያቱም ያለመሸብሸብ (shrinkage) የአየር አረፋ ሳይፈጥር ይደርቃል። በ95% ኤታኖል የሚሟሟ ሲሆን ከብዙ ዓመታት በኋላ በድጋሚ ለማንበር ያስችላል	ጎጂ ይዘቶች ስላለው ጥንቃቄ በሚፈልግ ማሽን (hood) ዉስጥ መያዝ አለበት። በኤታኖል ውሃን በማስወገድ ወደ ኤውፓራል ኤሰንስ (Euparal Essence) ማዛወር እንዳንድ ዝርያዎችን ተሰባባሪ ሊያደርግ ይችላል። ሆኖም ይህን ችግር በአይሶፕሮፓኖል (isopropanol) ማስወገድ ይቻላል።

ስም (Name)	ጠቀሜታዎች (Advantages)	ጉድለቶች (Disadvantages)
ሆየር ፍሉድ Hoyer fluid	<p>ናሙናዎች (Specimens) በሕይወት እንዳሉ ወይም በቀጥታ ከውሃ (water)፣ ከኤታኖል (ethanol) ወይም ከፎርማለዳይድ (formaldehyde) ዉስጥ በማዉጣት ማንበር ይቻላል። ናሙናን ማለስሰሱ (Maceration) እጅግ በጣም ጥሩ የቆዳ/ሽፋን (cuticle) ጥራት ይሰጣል። ተስማሚ የብርሃን ነጸብራቅ መለኪያ (favorable refractive index) አለው፤ እንዲሁም ለበለጠ ንጽጽር (higher contrast) በአዮዲን ማቅለም (iodine staining) ይቻላል። በውስጡ ያለው አሴቲክ አሲድ (Acetic acid) የአርትሮፖድ ብልቶችን/አካላትን (arthropod appendages) ሊያስፋ (expand) ይችላል። አንዳንድ ናሙናዎች ለ 40–60 ዓመታት ያህል ሳይበላሹ ሊቆዩ (stable) ይችላሉ።</p>	<p>ማንበሪያ ዉህዱን (medium) በደረጃና በጥቂት በጥቂቱ ካልተጨመረ በስተቀር ደካማ የዕቃዎች ናሙናዎች (Delicate plant specimens) ሊጨማደዱ/ሊከማተሩ (collapse) ይችላሉ፤ ይህ ደግሞ ጊዜ የሚወስድ (time-consuming) ሂደት ነው። ከከወ ዓመታት ባነሰ ጊዜ ውስጥ በውስጡ ክፍተቶች (Cavities) እና ጥርኞች (crystals) ሊፈጠሩ ይችላሉ። እንደ ክሎራል ሃይድሬት (chloral hydrate) መጠን እና እንደ መቆያ ጊዜው ሁኔታ ማለስሰሱ (Maceration) ከተፈለገው በላይ ሊሆን (excessive) ይችላል። በማንበሪያዉ ውስጥ ያሉ ክፍሎች ሊለያዩ (separate) ይችላሉ፤ እንዲሁም በጥቂት ወራት ወይም ዓመታት ውስጥ ደቃቅ ቅንጣቶች (fine granulation) ሊታዩ ይችላሉ።</p>
CMCP-9 (= ካርቦክሲ ሜቲል ሴሎሎስ ፊኖል / carboxy methyl cellulose phenol)	<p>ናሙናዎች (Specimens) በቀጥታ ከውሃ (water)፣ ኤታኖል (ethanol)፣ ግሊሲሮል (glycerol) ወይም ፎርማለዳይድ ካላቸዉ ዉህዶች (formaldehyde-containing solutions) ዉስጥ በማዉጣት ማንበር ይቻላል፤ እንዲሁም አጠቃላይ ምርመራን ወይም ዝግጅትን ለማቀላጠፍ አስፈላጊ ሆኖ ሲገኝ የናሙናዎችን የውስጥ አካላት ማለስሰሰሰ (macerated) ይቻላል።</p>	<p>ይህ የማንበሪያ ዉህድ (medium) በጊዜ ሂደት ጥርኞችን (crystals) ሊያመጣና ሊጠቁር (darken) ይችላል፤ እንዲሁም አንዳንድ ጊዜ ናሙናዎችን ከተፈለገው በላይ ሊያለስሰሰ (macerate) ይችላል። ስለይዱ በጥንቃቄ በጠርዙ ካልታሸገ (ringed) በስተቀር፣ ወፈር ያሉ ናሙናዎች ሊሸሸሸሱ (shrink) እና በመሸፈኛ መስተዋቱ (coverslip) ጫፎች ዙሪያ ክፍተቶችን ሊፈጥሩ ስለሚችሉ በዚህ ዉህድ ውስጥ በጥሩ ሁኔታ አይቆዩም። ይህ ማንበሪያ ዉህድ ለቀለሙ ናሙናዎች (stained specimens) ወይም ለጠነከሩ ቁሶች (calcified materials) ተስማሚ አይደለም፤ እንዲሁም የማድረቂያ ጊዜው ከ CMC (ካርቦክሲ ሜቲል ሴሎሎስ / carboxy methyl cellulose) የበለጠ ዘገምተኛ (slower) ነው።</p>
ኤውኪት (Eukitt™)	<p>(terpineol)፣ ቶሎዊን (toluene) እና ዛይሊን (xylene) ጋር ተካታኝ ነው። ዉህዱ በመጠኑ አሲዳማ የሆነና በፍጥነት የመድረቅ ባህሪ አለው። በዕድሜ ብዛት የመጥቆር (darken) ባህሪው አነስተኛ ነው። ለተለያዩ ማቅለሚያዎች (stains) ተስማሚ ነው (ለምሳሌ፡- ፉክሲን (fuchsin)፣ ሄማቶክሳይሊን (hematoxylin)፣ ሜቲል ግሪን (methyl green)፣ ሜቲል ቫዮሌት (methyl violet)፣ ሜቲሊን ብሉ (methylene blue)። ናሙናዎችን (Specimens) ከዓመታት በኋላም ቢሆን በዛይሊን (xylene) ውስጥ ለረጅም ጊዜ በመዘፍዘፍ መልሶ ማንበር (re-mounted) ይቻላል።</p>	<p>ጎጂ የሆኑ ይዘቶች (harmful components) ስላለው የግድ ጥንቃቄ በሚፈልግ ማሸጎን (hood) ዉስጥ መያዝ አለበት። የተሟላ እና ረጅም ጊዜ የሚወስድ የውሃ ማስወገድ ቅደም ተከተል (full, time-consuming dehydration series) ያስፈልገዋል። የመሸብሸብ (shrinkage) እና የጋዝ አረፋዎችን የመፈጠር (gas-bubble formation) ባህሪ ስላለው ወፈር ላሉ ናሙናዎች (thicker specimens) ተስማሚ አይደለም። መስታወቱ በደንብ ካልተጸዳ እና ካልታሸገ (sealed) በስተቀር የመሸፈኛ መስተዋቶች (Coverslips) በጊዜ ሂደት ሊለቀቁ (detach) ይችላሉ። በህብረ ህዋስ ዉስጥ የሚገኝን ኮላጅን ፋይበር (collagen fibers) የማጠንከር ብቃቱ ዝቅተኛ ነው።</p>
ኤነሲ (Enecê)	<p>በያንስ ለ50 ዓመታት የሚቆይ እጅግ ዘላቂ ዉህድ (Highly durable medium) ነው። ኤነሲ በጊዜ ሂደት የመጥቆር (darken) ባህሪ አያሳይም። ይበልጥ ተጠፍጣሬ (malleable) በመሆኑ ነፍሳትን በዉህዱ ውስጥ ሆኖ ለመበለት (dissection) እንዲሁም የቅርጽ መዋቅሮችን (morphological structures) ለማስተካከል ያስችላል።</p>	<p>የተሟላ እና ረጅም ጊዜ የሚወስድ የውሃ ማስወገድ ቅደም ተከተል (full, time-consuming dehydration series) ያስፈልገዋል። በኤታኖል (Ethanol) ውሃን በማስወገድ ወደ ቅርንፉ ዘይት (clove oil) ማዛወር አንዳንድ ናሙናዎችን (specimens) ተሰባባሪ (brittle) ሊያደርግ ይችላል። ዉህዱ የተነበሩ ነፍሳትን በዝግታ የማጥራት (clarified) ሂደቱን ስለማያቋርጥ ጥቃቅን የሆኑ</p>

የተበለቱ የአሸዋ ትንኝ አካላት ተሰብስበው ውሃን የማስወገድ (dehydration) እና በሙጫ (resin) የማንበር ሂደት ከመከናወኑ በፊት ትናንሽ ጉድጓዶች ባሏቸው ሳህኖች (ልክ ለዲኤንኤ/አርኤንኤ (DNA/RNA) ማጣራት እንደሚያገለግሉ ሳህኖች ዓይነት) ውስጥ በውሃ መለቅለቅ አለባቸው። ስለይዱን ከመበተን በፊት መጀመሪያ የማንበሪያ ውህድ ዓይነት ማወቅ ያስፈልጋል። ለውሃማ ውህዶች ውሃን መጠቀም ሲገባ፣ እንደ ካናዳ ባልሳም ወይም ዩፓራል ላሉ የሙጫ

ውህዶች ግን ዛይሊን (Xylene) መጠቀም ያስፈልጋል። ዛይሊን መርዛማ ስለሆነ በጭስ መሳሰሊያ (Fume hood) ዉስጥ መጠቀምና እንደ ማስከ ያሉ የግል ጥንቃቄ መሣሪያዎችን መጠቀም ያስፈልጋል። የሙነነ አምሳያ (Type specimen) ናሙናዎችን መልሶ ማስተካከል የሚቻለው የክምችቱ ጠባቂ (Curator) ወይም የባለቤቱ ተቋም ፈቃድ ሲሰጥ ብቻ ነው።

6. የትንሽ ዝርያዎች ልየታ (Specimen identification)

6.1. የአካል ቅርፅ ጥናት (Morphology)

የአሸዋ ትንሹን ዝርያ ልየታ በዋነኛነት የተመሠረተው በአካላዊ ባህሪያቸው ምርመራ ላይ ነው። ይህም የደረታቸውን፣ የክንፋቸውን፣ የመራቢያ አካላቸውን፣ የጸጉሮቻቸውን (setae) ቅርጽ እና በተለያዩ መዋቅሮች መካከል ያለውን ልኬታዊ ዝምድና (morphometric relationships) ማየትን ያካትታል። ተመራማሪዎች የተሰበሰቡትን ናሙናዎች ከታወቁ ዝርያዎች ጋር ለማነጻጸር የዝርያ ምደባ ቁልፍ መለያዎች (keys)፣ የማጣቀሻ ስብስቦችን እና የቀደሙ የዝርያ መግለጫዎችን ይጠቀማሉ።

እንደ የክንፍ ደም መላሾች (wing venation) እና የሁለቱም ጾታዎች የራስ ቅርጽ፣ የወንዶች መራቢያ አካል መዋቅር፣ እና የሴቶች የዘር ማከማቻ ከረጢት (spermathecae) አቀማመጥ ያሉ ቁልፍ መለያዎች ለዝርያ ልየታ ውሳኔ በጣም ጠቃሚ ናቸው። ትክክለኛ ልየታ ለማግኘት ዝርዝር የአገላ መነጻጸር ምርመራ ያስፈልጋል፤ ይህም አብዛኛውን ጊዜ ጥቃቅን የአካል ክፍሎችን (እንደ መራቢያ አካላት) ለማየት ከምጋውንድ ማይክሮስኮፕ፣ ወይም ጉልህ አካላዊ ባህሪያትን ለማየት ስቴሪዮ-ማይክሮስኮፕን መጠቀም ያስፈልጋል።

በምስል ቴክኖሎጂ (Imaging technology) በኩል የተመዘገቡት የቅርብ ጊዜ ውጤቶች በዲጂታል ምስል አማካኝነት የአሸዋ ትንሹን የዝርያ ልየታ ጥረትን አቅልለውታል። ከፍተኛ ጥራት ያላቸው ፎቶግራፎች ወይም ቁልፍ የአካል ክፍል መለያዎችን (Key features) የሚያሳዩ ዲጂታል ስዕሎች፣ ቀድሞ ከተዘጋጁ የማጣቀሻ ሰነዶች ጋር ለማነጻጸር ወይም በኮምፒውተር የታገዙ የመለያ ዘዴዎችን (Computer-assisted identification systems) በመጠቀም ለመተንተን ያስችላሉ። ይህ አሰራር በስነ-ቅርጽ ጥናት (Morphological taxonomy) ላይ የሚታየውን ትክክለኛነት ከማሻሻሉም በላይ፣ መረጃዎቹን በቀላሉ ለማግኘት ትልቅ እድል ፈጥሯል።

6.2. የክንፍ ጂኦሜትሪ (Wing geometry)

የክንፍ ጂኦሜትሪ የተለያዩ የአሸዋ ትንሹ ዝርያዎችን ለመለየት እና ለመመደብ የሚያገለግል ቁልፍ ባህሪ ነው። የአሸዋ ትንሹን ክንፎች ልዩ ንድፍ እና መዋቅር አላቸው፤ አብዛኛውን ጊዜ ረጅም፣ ጠባብ እና በሚገባ የዳቦሩ የደም መላሽ ቧንቧዎች (venation) አሏቸው (ምስል 9 እና 10)። የደም መላሾቹ አቀማመጥ እንደ ዝርያው የሚለያይ በመሆኑ ለመለያነት ጠቃሚ ግብዓት ይሆናል። በመሆኑም የክንፍ ጂኦሜትሪ ጥናት ለዝርያ ምደባ ጠቃሚ ግንዛቤዎችን ይሰጣል።

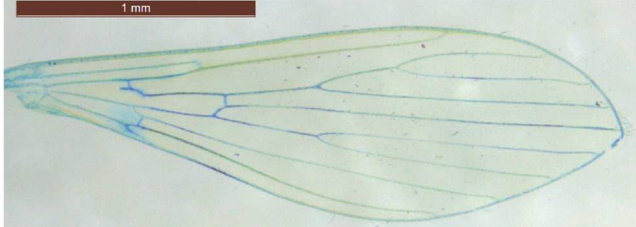
6.3. የክንፍ ጂኦሜትሪያዊ ቅርፅ ልኬት (Wing geometric morphometrics)

ተመራማሪዎች የተለያዩ የአሸዋ ትንሹ ዝርያዎችን ወይም ስብስቦችን (Populations) የክንፍ ቅርጽና መጠን ለማጥናት እና ለማነጻጸር እንደ ጂኦሜትሪያዊ ቅርፅ ልኬት (Geometric morphometrics) ያሉ ዘዴዎችን ይጠቀማሉ። የክንፍ ጂኦሜትሪን ማጥናት ስለ ትንሹ ጠባይ፣ ስለሚመርጡት የመኖሪያ አካባቢ (Habitat) እና ስለ በረራ አቅማቸው ጠቃሚ መረጃዎችን ይሰጣል።

በዚህ የጂኦሜትሪያዊ ቅርፅ ልኬት አሰራር ወቅት ክንፎቹ በጥንቃቄ ተበልተው፣ አስፈላጊ ሆኖ ሲገኝም ቀልመው (Stained)፣ በስላይድ ላይ ተዘረጋግተው ይጫናሉ። የተዘጋጁት ስላይዶች በስቲሪዮ ማይክሮስኮፕ (Stereomicroscope) አማካኝነት ፎቶግራፍ ከተነሱ በኋላ ምስላቸው ወደ ዲጂታል ይቀየራል፤ በመጨረሻም የጂኦሜትሪያዊ ቅርፅ ልኬት ትንተና ይደረግባቸዋል። ይህ አሠራር በሳይንሳዊ ጽሑፎች ውስጥ በሚገባ ተብራርቷል [6, 27, 42, 56, 57, 59]። የተዛባ የዕድገት ተጽዕኖን (Negative allometric effects) ለማስወገድ ሁልጊዜ የቀኝ ወይም የግራ ክንፍን በቋሚነት መጠቀም ይመከራል [62]።



ምስል 9:- የትሪኮፎሮማያ ኢነሚ (Trichophoromyia inimii) ያልቀለመ ክንፍ።



ምስል 10:- የቀለመ የፍሌቦቶሙስ አሪያሲ (Phlebotomus ariasi) ክንፍ።

ለጂኦሜትሪያዊ ቅርፅ ልኬት ትንተና የሚደረግ የክንፍ ዝግጅት (Wing preparation for geometric morphometric analysis)

የክንፍ ደም መላሾችን (wing veins) በጥሩ ሁኔታ ለማየት፣ ክንፎቹ ከቅርፊቶች (scales) መጽዳት እና በተገቢው ሁኔታ መቅለም አለባቸው። ለክንፍ ዝግጅት፣ በመጀመሪያ ትናንሽ የሳህን ጉድጓዶችን (wells) በሚያስፈልጉት ምላሽ ሰጪ ንጥረ ነገሮች (reagents) ማለትም ሜቲሊን ብሉ (methylene blue)፣ ኤታኖል (Ethanol)፣ ውሃ እና ዛይሊንን (xylene) በሚተኩ ኬሚካሎች (xylene substitute) መሞላት አለበት። በተመጣጣኝ ሙቀት (room temperature) በ 70% ኤታኖል ውስጥ ተጠብቆ የቆየ ክንፍን፣ ከተቀመጠበት ኤፔንድሮርፍ ቲዩብ (Eppendorf tube) ሙሉ በሙሉ በመገልበጥ ወደ ጉድጓዱ መጨመርና በመቀጠልም ክንፉን ረዘም ባለ ቀጭን ጠማማ መርፌ ወደ ላይ ማንሳት። በክንፉ ላይ ያሉትን ጠንካራ ፀጉሮች (bristles) ለማስወገድ ክንፉን ከአልኮል ወደ ውሃ፣ ከዚያም መልሰው ወደ አልኮል በፍጥነት ያሻግራት። ክንፉን ለ 6 ደቂቃ ያህል በሜቲሊን ብሉ (methylene blue) ውስጥ ማቆየት፣ በዚህ ወቅት ክንፉ በቀለሙ ላይ መንሳፈፉን ማረጋገጥ ያስፈልጋል። ክንፉን በጥንቃቄ በማውጣት ለ2 ደቂቃ ያህል (በሜቲሊን ብሉ ውስጥ የቆየበትን አንድ ሦስተኛ ያህል ጊዜ) በዛይሊን ተኪ ኬሚካል (xylene substitute) ውስጥ ይዘፍቁት። ክንፉ እንዲሰምጥ ለማድረግ መርፌውን በጉድጓዱ ግድግዳ ላይ በቀስታ መታ መታ ማድረግ ይረዳል። የዛይን ተኪ ኬሚካል የትንፋስ ክንፍ ተፈራክሮ የቀለም ይዘት እንዲጸና (fix) የማድረግ ተግባር ያከናውናል። በመጨረሻም፣ ክንፉን በማንሳት በማይክሮስኮፕ ስላይድ ላይ ባለ ትንሽ የዩፓራል (Euparal®) ጠብታ ላይ ማሳረፍ። አገላ መነጻጸር (magnifying lens) በመጠቀም፣ ክንፉን በቀስታ በመዘርጋት የሽፋን መስተዋቱን (coverslip) በጥንቃቄ ማፍር። ዩፓራል ደርቆ ሳይጠናከር በፊት ወዲያውኑ ፎቶግራፎች መነሳት አለባቸው። የክንፎችን ትክክለኛ አቀማመጥ (optimal alignment) ለማግኘት በሽፋን መስተዋቱ ስር የክንፉን አቀማመጥ በመጠኑ ማስተካከል ሊያስፈልግ ይችላል።

6.4. የሞለኩላር ባዮሎጂ ቴክኒኮች

ከአካላዊ ቅርፅ (morphological) ጥናት በተጨማሪ፣ የሞለኩላር ዘዴዎች በሥነ ነፍሳት ምርምር ሥራ አስፈላጊ እየሆኑ መጥተዋል። እነዚህም የዝርያ ምደባ፣ የዝርያ ጄኔቲክስ እና የዝርያ ለውጥ (phylogenetic) ጥናቶችን እንዲሁም የበሽታ አምጪ ተህዋሲያን ዲኤንኤ/አርኤንኤ (DNA/RNA) ፍሊጋን እና የደም ምግብ ምንጭን ለመለየት ያገለግላሉ [70]። የዲኤንኤ ቅደም ተከተል ምርመራ (DNA sequencing) ዝርያዎችን ለማረጋገጥ ወይም ተመሳሳይ የሆኑ ዝርያዎችን ለመለየት አስተማማኝ ዘዴ ነው። በተጨማሪም፣ ፒሲኦር (PCR)፣ የዲኤንኤ ቅደም ተከተል ምርመራ (DNA sequencing) እና የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ (NGS) የተባሉ ሞለኩላር ቴክኒኮች እንዲሁም ማልዲ ፍጽ ኤም ኤስ (MALDI-ToF MS) ከባህላዊው የአካላዊ ቅርፅ ጥናት ጎን ለጎን ፈጣን እና ትክክለኛ መለያ በመሆን እያገለገሉ ነው [46]። እነዚህ የቴክኖሎጂ እድገቶች ቢኖሩም፣ የአካላዊ ቅርፅ ጥናት ለዝርያ ምደባ እንደ መሠረታዊ መመዘኛ እና የሞለኩላር መረጃዎችን ለመተርጎም እንደ መነሻ ያገለግላል።

6.4.1. አካላዊ ቅርፅ አፍራሽ የሆነ የኒውክሊክ አሲድ ወጣት (Destructive nucleic acid extraction)

የኒውክሊክ አሲድ ወጣት (Nucleic acid extraction) በብዙ የሥነ ህይወት ጥናቶች ውስጥ የተለመደ ተግባር ሲሆን፣ ዲኤንኤን (DNA) ከኖሎምቶች ወስጥ ለይቶ ለማወጣት የሚያስችሉ የተለያዩ ዘዴዎች አሉ። ይህንን ሂደት የሚያቀላጠፉ በገበያ ላይ የሚገኙ በርካታ የዲኤንኤ ማውጫ ኪቶች (Kits) አሉ። ሆኖም ግን፣ የአርትሮፖድ (arthropod) ናሙናዎችን ለአካላዊ ቅርፅ ጥናት (morphological identification) ለማዘጋጀት በብዛት ጥቅም ላይ የሚውሉ ዘዴዎች የኖሎምቶች ወሳኝ አካላዊ ባህሪያት ሊያበላሹ ወይም ሊያጠፉ ይችላሉ። አብዛኞቹ ከነፍሳት ህብረ ህዋሳት ዲኤንኤን ለማወጣት የሚያገለግሉ ደንበ ክንፍኖች (protocols) በባህሪያቸው አፍራሽ (destructive) ናቸው፤ ስለሆነም በጥቃቅን ናሙናዎች የሚከናወኑ ሥራዎች አዳጋች ናቸው፤ ምክንያቱም የኖሎምቶች አወሳሰዱ ጠቃሚ የሆኑ ስነ-ቅርጻዊ መገለጫዎችን ሊያዛባ ይችላል። ተገቢውን የዲኤንኤ ወጣት ዘዴ ለመምረጥ የኖሎምቶች ዓይነት እና ሁኔታ ወሳኝ ሚና አላቸው [29]። የአሸዋ ትንኞችን በትክክል የመለየት፣ የሰብስብ ኩነታትን (population dynamics) የመረዳት እና በሌሎች ነፍሳት ላይ የሚደርሰውን ተጽዕኖ የመቀነስ አስፈላጊነት ለሞለኩላር መመርመሪያ መሣሪያዎች ዕድገት መነሻ ሆኗል [23]። በአሁኑ ጊዜ የሞለኩላር ዘዴዎች የአሸዋ ትንኞችን ለመለየት ከመደበኛ የስነ-ቅርጽ የዝርያ ምደባ ዘዴዎች ጋር እንደ ማሟያነት በሰፊው ጥቅም ላይ ይውላሉ። ለምሳሌ፣ መደበኛው የነፍሳት ባርኮድ (Insect barcoding) አሰራር የዲኤንኤ አመጣጥን እና ቅደም ተከተል ምርመራን (Sequencing) የሚያካትት ሲሆን፣ ይህም ብዙውን ጊዜ የዋናው ናሙና (Original specimen) መጥፋት ወይም መበላሸት ያስከትላል። ስለሆነም፣ ናሙናዎች ሆነ የኖሎምቶች ስነ-ቅርጽ ይዘቱን ሳይጎዱ አፍራሽ ያልሆነ (Non-destructive) የዲኤንኤ ወጣት ዘዴዎችን መፈለግ አስፈላጊ ሆኗል። ኑክሊክ አሲድን ከአሸዋ ትንኝ ለማውጣት በርካታ ዘዴዎች ጥቅም ላይ ይውላሉ። የሚወጣው የኑክሊክ አሲድ መጠንና ጥራት ቀጣይ ለሆነው የሞለኩላር ትንተና ውሳኝነት አለው። ምክንያቱም የተለያዩ ቴክኒኮች የየራሳቸው የሆነ የጥራት እና የምርመራ ክዋኔ (sensitivity) ፍላጎት ስላላቸው ነው [9]። ለምሳሌ የአሸዋ ትንኝ ዓይኖች የፒሲኦር (PCR) ሂደትን የሚያስተጋግሉ ንጥረ ነገሮች እንዳሏቸው ተደርሰታል [69]። ከበሽታ ምርመራ ባለፈ የትንኞችን ዝርያ ለመለየት ዲኤንኤን ማውጣት የተለመደ ተግባር ቢሆንም፣ ውጤቱ እንደ አጠቃቀሙ ዘዴ ይለያያል። ተመራማሪዎች የተሻለ ጥራትና መጠን ለማግኘት ሲሉ [8፣9፣69] ፋብሪካዎች ያዘጋጁቸውን የዲኤንኤ ወጣት መመሪያዎች ለአሸዋ ትንኝ በሚሰማማ መልኩ አሻሽለው ይጠቀማሉ [8]፤ እንዲሁም ለሌሎች ነፍሳት የተዘጋጁ የዲኤንኤ (DNA)

ወጣት መመሪያዎች ለአሸዋ ትንኝ መጠቀም ይቻላል [58፣76]። አነስተኛ የሚቶኮንድሪያል ዘረ መል የሆኑትን (COI ወይም CytB) አላማ የሚያደርጉ መለያ የፒሲኦር (PCR) ምርመራዎች፣ በአጠቃላይ የዲኤንኤ መቆራረጥን (DNA fragmentation) ከሚያስከትሉ የወጣት ዘዴዎች ጋር ተኳሃኝ ናቸው። በአንጻሩ ሌሎች ረጅም-ንባብ ያላቸው የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ (NGS) ቴክኒኮች (Oxford Nanopore እና PacBio) በብዛት ያልተቆራረጠ እና ከፍተኛ ጥራት ያለው የዲኤንኤ (DNA) ይፈልጋሉ። በአምደ ሽክርክሪት (Spin column) የሚወጣ ዲኤንኤ እስከ 60 ኪሎ ቤዝ (kb) የሚረዝመው ቁርጥራጮችን ሲሰጥ፣ በፊኖል-ክሎሮፎርም (Phenol-chloroform) የሚከናወነው ወጣት ግን እስከ 150 ኪሎ ቤዝ የሚደርሱ ረጅም የዲኤንኤ ቁርጥራጮችን ሊያስገኝ ይችላል [77]። ሰንጠረዥ 5 የአሸዋ ትንኝ ዲኤንኤ ወጣት ቴክኒኮችን የሚያጠቃልል ሲሆን፣ ለእነዚህ ነፍሳት ተብለው የተደረጉ የሥነ-ዘዴ ማስተካከያዎች (methodological adaptations) መኖራቸውን ያመለክታል። የሚገኘው የዲኤንኤ መጠን (Yields) በኖሎምቶች መጠን እና በዝግጅት መመሪያዎች ላይ ስለሚወሰን አልተገለጸም። በሰንጠረዥ ላይ ያለው የማሻሻያ (modification) አምድ የሚያመለክተው ለአሸዋ ትንኞች ወይም ለሌሎች ትናንሽ አርትሮፖዶች የተደረጉ የወጣት መመሪያ (extraction protocols) ማስተካከያዎችን ነው።

የዲኤንኤ ወጣት ዘዴን በሚመርጡበት ጊዜ እንደ የኖሎምቶች ቁጥር፣ ለወጣት የሚፈጅ ዊዘ እና ከወጣት በኋላ ጥቅም ላይ የሚውለውን ቴክኒክ (downstream technique) የመሰሉ በርካታ መስፈርቶችን ግምት ውስጥ ማስገባት ያስፈልጋል። ምንም እንኳን የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ ቴክኒኮች (NGS) ከፍተኛ ሞለኩላር ክብደት ያለው ዘረ መላዊ ዲኤንኤ (Genomic DNA) ቢፈልጉም፣ እዚህ የቀረበት የዲኤንኤ ወጣት ዘዴዎች ለመደበኛ ፒሲኦር (PCR) ተግባራት ሊውሉ ይችላሉ። በተጨማሪም፣ በርካታ ጥናቶች ለትናንሽ የየብስ አርትሮፖዶች፣ በደረቅ ሁኔታ ለተቀመጡ የመዘደም ናሙናዎች እና ለሰላሳ አካል ላላቸው አርትሮፖዶች ናሙናውን ሳይበላሹ የዲኤንኤ ወጣት ዘዴዎችን (non-destructive DNA extraction methods) ቃኝተዋል [19, 26, 28, 55, 63]።

6.4.2. አካላዊ ቅርፅ አፍራሽ ያልሆነ የኒውክሊክ አሲድ ወጣት (Non-destructive nucleic acid extraction)

በአሸዋ ትንኞች ሞለኩላር ጥናት ካሉት ዋና ዋና ተግባሮች አንዱ፣ ናሙናዎች በኢንቶሞሎጂካል ስብስቦች ውስጥ እንዲከተቱ በሚያስችል መልኩ ደህንነታቸውን ጠብቆ ማቆየት አለመቻሉ ነው። አብዛኛዎቹ የዲኤንኤ (DNA) ወጣት መመሪያዎች የትንኝን አካል ማስለስን ስለሚጠይቁ፣ ዋና ናሙናውን ያበላሻሉ። ይሁን እንጂ፣ አፍራሽ ያልሆኑ የኒውክሊክ አሲድ ወጣት ዘዴዎች ናሙናውን በአካል ሳይጎዱ፣ ሳይቀደዱ ወይም የአካል ቅርጹን ሳይለውጡ የዘረ መላዊ ናሙናዎችን ለማውጣት ታስበው የተዘጋጁ ናቸው። እነዚህ ዘዴዎች በተለይ እንደ አሸዋ ትንኝ ያሉ ብርቅዬ ወይም ውስን ናሙናዎች ሲያጋጥሙ፣ ለአካላዊ መለያ (Taxonomy) ወይም ለወደፊት ምርመራዎች የሰውነትን መዋቅር ጠብቆ ማቆየት አስፈላጊ በሚሆንበት ጊዜ እጅግ ጠቃሚ ናቸው። ለዚህም በብዛት ጥቅም ላይ የሚውለው ዘዴ ትንኞቹን በፕሮቴይን ኬ (proteinase K) ማሟሚያ ፈሳሽ (lysis buffer) ውስጥ በጥንቃቄ የመዘፈቅ ዘዴ ነው። በተጨማሪም መጠነኛ የህብረህዋስ መፈራረስ (Mild-vectolysis) ዘዴ የተለመደውን የዲኤን-ኢ.ዚ ብለድ ኤንድ ቲሹ ኪት (DNeasy Blood and Tissue kit) አሰራር በመቀየርና የማቀዘቀዝ ሂደትን በመጨመር ለታወቁ ብርቅዬ ናሙናዎች ጥቅም ላይ ይውላል። በሌላ በኩል ደግሞ የሆትሾት (HotSHOT) ዘዴ ፈጣን እና ርካሽ አማራጭ በመሆን ያገለግላል። መጠነኛ የህብረህዋስ መፈራረስ (Mild-vectolysis) የተባለው ዘዴ በአሸዋ ትንኞች፣ በተለይም በሙክ አምሳያ (type specimen) ላይ በተሳካ ሁኔታ ተተግብሯል [24]። ይህ ቴክኒክ የተለመደ የአምደ ሽክርክሪት (spin

ሠንጠረዥ 5:- የአሸዋ ትንኞችን ዘረመላዊ ዲኤንኤ (gDNA) ለማውጣት የሚያገለግሉ ማሻሻያ ደንብ ክንፈኖች እንዲሁም አማካኝ ዋጋ እና አገልግሎታቸው።

ፕሮቶኮል (Protocol)	ዋጋ (Cost)	አገልግሎት (Application)	ለጥቃቅን ነፍሳት የተመቻ የፕሮቶኮል ማሻሻያ ስለመደረጉ የሚገልፅ ማጠቃለያዎች
ስፒን ኮለም (Spin column)	2.5 – 3.55 የአሜሪካ ዶላር [39]	PCR, የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ (NGS)	[9]
ፊኖል-ክሎሮፎም (Phenol-chloroform)	0.24 የአሜሪካ ዶላር [69]	ፕሲኦር (PCR), የቀጣዩ ትውልድ የዘረ መል ኮድ ቅደም-ተከተል መለያ (NGS)	[9]
ሆት-ሾት (HotSHOT)	<0.01 የአሜሪካ ዶላር [69]	ፕሲኦር (PCR)	-
ልቲንግ አውት (Salting out)	0.12 የአሜሪካ ዶላር [69]	ፕሲኦር (PCR)	-
ቼሌክስ (Chelex)	0.02 የአሜሪካ ዶላር [41]	ፕሲኦር (PCR)	[41, 76]

column) ኪት ለምሳሌ:- ዲኤን-ኢ.ዚ ብለድ ኤንድ ቲሾ ኪት (DNeasy Blood and Tissue kit, QIAGEN, Hilden, Germany) በመጠቀም፣ ነገር ግን ናሙናውን ሳይሰባብሩ ዲኤንኤ ለማግኘት እንዲያስችል ተደርጎ የተሻሻለ ነው። የተስተካከሉ የማሟሟያ ደረጃዎች (የፈሳሹ መጠን መጨመር እና የማቀዝቀዝ ሂደት ማካተት) [17] አካላዊ ጉዳትን በትንሹ በመቀነስ ኒውክሊክ አሲዶች እንዲወጡ ያስችላሉ [24]። በተጨማሪም፣ ለአሸዋ ትንኞች ፈጣን እና ርካሽ የሆነውን የሆትሾት (HotSHOT DNA Extraction, Bento Bioworks Ltd, London, United Kingdom) ኪት መጠቀም ይቻላል [73]።

ለሥነ-ቅርጽ (morphological) መለያ የታሰቡ የኢንቶሞሎጂ ናሙናዎች ከሂደቱ በኋላ ሊታጠቡ ይችላሉ። በዲኤን-ኢ.ዚ ብለድ ኤንድ ቲሾ ኪት (DNeasy Blood and Tissue kit) የዲኤንኤ ውጣት የተከናወኑ ናሙናዎች በማርክ-አንድሬ (Marc-André) ወህድ መጽዳት ያለባቸው ሲሆን፣ በሆትሾት (HotSHOT DNA extraction kit) የተከናወኑ ናሙናዎች ግን በጥራት እንዲታዩ፣ በዚህ ጽሑፍ ውስጥ በዝርዝር በቀረበው መመሪያ [73] መሠረት በውሃማ ወህድ ውስጥ፣ ወይም ይበልጥ በተሻለ ሁኔታ ውሃው ከተወገደ (dehydration) በኋላ በሙጫ (resin) ውስጥ ማንበር አስፈላጊ ነው። በመቀጠል የተጣራው የዘረ መል ናሙና ለተጨማሪ ትንተናዎች ሊወጡ

ይችላል፣ ለምሳሌ የተወሰኑ የዘረ መላዊ መለያዎችን (genetic markers) በፕሲኦር (PCR) ለመመርመር። ናሙናን ሳያጠፉ የኩክሊክ አሲድ ውጣት ዘዴዎች የአሸዋ ትንኞችን ዘረመላዊ ባህሪያት ለማጥናት ወሳኝ ናቸው። ይህም ትንኞቹ ሊሸከሟቸው የሚችሉ በሽታ አምጪ ተህዋስያንን መለየትንም ያካትታል። የናሙናውን ሙሉነት (integrity) በመጠበቅ፣ ተመራማሪዎች ጠቃሚ ዘረመላዊ መረጃዎችን ማግኘት ይችላሉ፤ በተመሳሳይ ጊዜ ናሙናውን ለተጨማሪ ትንተናዎች ወይም ጥናቶች ማቆየት ያስችላቸዋል።

6.5. ማልዲ ቶፍ ኤስ (MALDI-ToF MS)

ማልዲ ቶፍ ኤስ (MALDI-ToF MS = matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ሥነ ህይወታዊ ናሙናዎችን ልዩ የፕሮቲን መገለጫ አሻራዎች (protein 'fingerprints') በመለየት ላይ የተመሠረተ የትንተና ዘዴ ነው። ይህ ዘዴ ለሕክምና እና ለአንስሳት ሕክምና ጠቀሜታ ያላቸውን ነፍሳት (arthropods) ለመለየት እንደ አስፈላጊ መሣሪያ አይታወቅ መጥቷል።

ይህ ዘዴ የአሸዋ ትንኞችን በተለያዩ የእድገት ደረጃዎች መለየት እንደሚችል ተረጋግጧል። እንዲሁም ደም የመጠጠ ሴት ትንኞች የተመጣቡትን የደም ዓይነት ለመለየት ይጠቅማል። በተጨማሪም በተለያዩ የቅየጣና (homogenization) የማቆያ(storage) ሁኔታዎች ውስጥ የተቀመጡ ወንድና ሴት ናሙናዎችን በዝርያ፣ በወገን እና በመንጋ ደረጃ ለመለየት ያስችላል [28, 30, 73, 74]። ይህ ቴክኒክ ተመራማሪዎች ትንኞችን በፍጥነት እና በትክክል እንዲለዩ በማድረግ ስለ ስርጭታቸው፣ ስለ ባህሪያቸው እና በሽታን በማስተላለፍ ረገድ ስላላቸው ሚና ጠቃሚ መረጃ ይሰጣል።

ማልዲቶፍ (MALDI-ToF) የፕሮቲን መገለጫ አሻራዎች (protein profiles) ላይ በመመሥረት፣ በዝርያዎች መካከል ያለውን ልዩነት በመለየት፣ በኤፒዲሚዮሎጂያዊ ጥናቶች እና በተባይ መቆጣጠሪያ ስልቶች ውስጥ ወሳኝ ሚና ይጫወታል። ይህ ዘዴ በመደበኛነት ጥቅም ላይ እንዳይውል እንቅፋት የሆኑ ሁለት ዋና ዋና ድክመቶች አሉ።

አንደኛው፣ የመጠነ ቁስ ስፔክትሮሜትሪ (mass spectrometry equipment) ተደራሽነትን የተመለከተ ሲሆን፣ መሣሪያው እጅግ ውድ ከመሆኑ የተነሳ ለአሸዋ ትንኞች ወይም ለሌሎች ነፍሳት ዝርያ መለያ ዓላማ ብቻ መግዛት አዋጪ አለመሆኑ ነው። ይሁን እንጂ፣ በክሊኒካዊ ምርመራ ማዕከላት ወይም በፕሮቲዮሚክ የምርምር ተቋማት ውስጥ የምርመራ ጊዜ ድርሻ በማግኘት ይህንን ችግር መፍታት ይቻላል። ሁለተኛው እንቅፋት በገደብ የለሽ የመረጃ ቋቶች (Open-access databases) ውስጥ የሚገኙ የአሸዋ ትንኝ ዋቢ መረጃዎች ዉሉን መሆን ነው፤ ይህም ጉድለት ተመራማሪዎች የራሳቸውን የውስጥ መረጃ ቋት (In-house database) እንዲገነቡ ያስገድዳቸዋል። ይህንን ጉድለት ለመሙላት የስነ-ቅርጽ (Morphology) እና COI ወይም cytB ያሉ ተስማሚ የዘረ መል መለያ ዘዴዎችን መጠቀም ያስፈልጋል። ይህ ውስንነት ፓሪስ በሚገኘው ሶርቦን ዩኒቨርሲቲ (Sorbonne University) እና ብራሰልስ (Brussels) በሚገኘው BCCM/IHEM/Sciensano ናሙና ክምችት በሚያስተዳድሩት የኤም ኤስ አይ ፕላትፎርም (MSI Platform) (<https://msi.happy-dev.fr/>) ውስጥ አስከሁን በተለያዩ የምርምር ተቋማት የሚገኙ የመረጃ ቋቶች ደረጃ በደረጃ ሲካተቱ በቅርቡ እንደሚፈታ ተስፋ ይደረጋል።

የማልዲቶፍ (MALDI-ToF) ፕሮቲን መገለጫ የአሻራ ምርመራ ለማድረግ በሚታቀድበት ጊዜ፣ ናሙናዎች በክፍል ሙቀት ሳይጋለጡ በደረቅ ሁኔታ ቀዝቅዘው (dry-frozen) ወይም ሞለኪውላዊ ጥራቱን በተጠበቀ 70% ኤታናል ውስጥ መቀመጥ አለባቸው። ናሙናን ለማዘጋጀት የሚረዳ ሁሉን አቀፍ መመሪያ በሌለበት ሁኔታ፣ ተመራማሪዎች ያገኛቸው የፕሮቲን መረጃዎች እስከሁን ከታተሙት የአሸዋ ትንኝ መረጃዎች ጋር ሲነጻጸሩ እንዲችሉ፣ ለማልዲቶፍ (MALDI-ToF) ማትሪክስ ዝግጅት 60% አሴቶኒትሪል/0.3% የሲናፒኒክ አሲድ ዉህድ (TFA solution of sinapinic acid) (30 mg/mL) እንዲጠቀሙ ይመከራሉ።

ለማልዲቶፍ (MALDI-ToF MS) የሚደረግ የናሙና ዝግጅት (Sample Preparation for MALDI-ToF MS)

(ምስል 7)
በተለያዩ ሁኔታዎች ተጠብቀው የቆዩ የነፍሳት ናሙናዎች በመጀመሪያ በክፍል ሙቀት ውስጥ በአየር እንዲደርቁ ይደረጋል፤ ከዚያም ይበለታሉ (dissected)። ለሰላይድ ማንበሪያ እና ለሥነ-ቅርጽ (morphological) ትንተና የሚያገለግሉ ቁልፍ መለያ ባህሪያትን የያዙ የትንኝ አካል ክፍሎችን ለማግኘት ጭንቅላት እና ሆድ ዕቃ ተለይተዉ ይወጣሉ።

ደረቱ (thorax) ለማልዲቶፍ (MALDI-ToF) ምርመራ ሊያገለግል ይችላል፤ ቀሪው የሆድ ዕቃ ክፍል ደግሞ ለዲኤንኤ (DNA) ዉጣት ሊቀመጥ ይችላል። ለፕሮቲን መገለጫ ትንተና (protein profiling)፣ ደረቱን ወደ 1.5-ሚሊ ሊትር (mL) ማይክሮ-ቲዩቦች በማስተላለፍ 10 ማይክሮ ሊትር (μL) ማሟሟያ ዉህድ (homogenization solution) በመጨመር ለአንድ ጊዜ ብቻ በሚያገለግሉ መፍጫ መሳሪያዎች (pestles and pellets) አማካኝነት ይፈጫል። በተለምዶ ሁለት ዓይነት የማሟሟያ ፈሳሾች ጥቅም ላይ ይውላሉ፡- እነሱም የተጣራ (sterile) ውሃ እና 25% ፎርሚክ አሲድ (formic acid) ናቸው።

7. ማጠቃለያ (Conclusion)

በዚህ ሥራ ውስጥ፣ ተመራማሪዎች የአሸዋ ትንኞችን ትክክለኛ ዝርያ ለመለየት እና በሽታ አምጪ ተህዋሲያንን በቀላሉ ለመለየት እንዲችሉ፣ እንደ ምርምር ዓላማቸው የሚመረጡ ውጤታማ የናሙና ማንበር ዘዴዎችን ለማቅረብ ሞክረናል። ለሁሉም ሁኔታዎች የሚሆን አንድ ምርጥ ዘዴ የለም፤ ይልቁንም እያንዳንዳቸው የየራሳቸው ጠንካራ ጎን እና ጉድለት ያላቸው በርካታ አማራጮች አሉ።

የአሸዋ ትንኞችን ለማዘጋጀት እና ለመለየት የሚያገለግሉ የተለያዩ የማንበሪያ ቴክኒኮችን ዝርዝር መመሪያዎች በተጨማሪ መረጃዎች (Supporting data) ውስጥ አቅርበናል። እነዚህ መመሪያዎች የቪዲዮ ማሳያዎችን ጨምሮ፣ ለተለያዩ ዓላማዎች ተስማሚ የሆኑ ደረጃ በደረጃ የሚከናወኑ የአሠራር ቅደም ተከተሎችን ያሳያሉ፤ ይህም ትክክለኛ እና አስተማማኝ ውጤት ለማግኘት ይረዳል። ይህን በዝርዝር የቀረበ መመሪያ ዋና ዓላማዉ ተመራማሪዎች እንደ ፍላጎታቸው ተገቢውን የማንበሪያ ዘዴ መርጠው እንዲተገቡ መርዳት ነው።

ምስጋና (Acknowledgements)

የዚህ ሳይንሳዊ ፅሁፍ ባለቤቶች በለንደን የተፈጥሮ ታሪክ ሙዚየም (Natural History Museum of London, UK) ለሚገኙት ሪቻርድ ሌን (Richard Lane) እና ዞዩ ጄይ አዳምስ (Zoe Jay Adams)፣ ለዚህ ጽሁፍ ጥራት መሻሻል ላደረጉት ግሩም ግምገማ ምስጋናቸውን ያቀርባሉ።

የገንዘብ ድጋፍ (Funding)

ለአጃ (AJA) የምርምር ሥራ የገንዘብ ድጋፍ ላደረጉት የብራዚል የልማት ድርጅቶች ሲኤንፒኪው (CNPq) (የመዝገብ ቁጥር፡- 404395/2024-4) እና አራውካሪያ ፋውንዴሽን (Araucária Foundation) (የመዝገብ ቁጥር፡- 433/2025 PDI) ምስጋናቸውን እናቀርባለን።

10. የጥቅም ግጭት (Conflicts of interest)

ጆሮም ዴፓኩዊት (Jérôme Depaquit) የ "ፓራሳይት" (Parasite) ሳይንሳዊ መጽሔት ረዳት አዘጋጅ ነው፤ ሆኖም በዚህ ጽሁፍ የግምገማ ሂደት እና ውሳኔ አሰጣጥ ላይ ምንም ዓይነት ተጽዕኖ አልነበረውም። ሌሎች ደራሲዎች ምንም ዓይነት የጥቅም ግጭት እንደሌለባቸው ይገልጻሉ።

በዜናዶ (Zenodo) ላይ የሚገኙ ቪዲዮዎች

- እነዚህ ቪዲዮዎች የአሠራር ሂደቱን በዝርዝር የሚያሳዩ ናቸው፡-
- ቪዲዮ 1: <https://zenodo.org/records/18198006>
 - ቪዲዮ 2: <https://zenodo.org/records/18311158>
 - ቪዲዮ 3: <https://zenodo.org/records/18311106>
 - ቪዲዮ 4: <https://zenodo.org/records/18311154>
 - ቪዲዮ 5: <https://zenodo.org/records/18303014>
 - ቪዲዮ 6: <https://zenodo.org/records/18302850>
 - ቪዲዮ 7: <https://zenodo.org/records/18315029>

Supplementary material

The supplementary material of this article is available at <https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2026009/olm>

ማጣቀሻዎች (References)

1. አልካን ሲ (Alkan C)፣ አላል-ኢ ኸለፍ ኤሲ (Allal-Ikhlef AB)፣ አልዋሱፍ ኤስ (Alwassouf S)፣ ባክሎቲ ኤ (Baklouti A)፣ ፒዮርኮውስኪ ጂ (Piorkowski G)፣ ደ ላምባሊሪ ኤክስ (de Lamballerie X)፣ ኢዝሪ ኤ (Izri A) እና ቫሬል አርኤን (Charrel RN) 2015፡- በአልጄሪያ ውስጥ የቶስካና ቫይረስን ለይቶ ማውጣት፣ የጄኔቲክ ባህሪ መግለጫ እና በደም ውስጥ ያለው ስርጭት (Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria) *ክሊኒካል ማይክሮባሎጂ ኤንድ ኢንፌክሽን (Clinical Microbiology and Infection)*: 21(11): 1040 e1-9

2. አልተን ቢ (Alten B)፣ አቫሊ ዋይ (Ozbel Y)፣ ኤርጉናይ ኬ (Ergunay K)፣ ካሳፕ ኦኒ (Kasap OE)፣ ካል ቢ (Cull B) እና ሌሎች 2015፡- በአውሮፓ ውስጥ ለፍሌቦቶማን አሸባ ትንኞች ፍሎሳ አወሳሰድ ስልቶች (Sampling strategies for phlebotomine sand flies in Europe) *ቡላቲን ኦፍ ኢንቶሞሎጂካል ሪሰርች (Bulletin of Entomological Research)*: 105(6): 664-78

3. አይሃን ኤን (Ayhan N)፣ ባክሎቲ ኤ (Baklouti A)፣ ፕሩዶም ጆ (Prudhomme J)፣ ዋልደር ጂ (Walder G)፣ አማሮ ኤፍ (Amaro F) እና ሌሎች 2017፡- በአሸባ ትንኞች በሚተላለፉ ፍሌባቫይረሶች ላይ ለሚደረጉ ጥናቶች ተግባራዊ መመሪያዎች (Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses)። *ቬክተር-ቦርን ኤንድ ዙፍቲክ ዲዚዝስ (Vector-Borne and Zoonotic Diseases)*: 17(1): 73-80

4. ቤተሰ ፒኤ (Bates PA) 1997፡- የአሸባ ትንኞች በሌሽማኒያ መበከል (Infection of phlebotomine sandflies with Leishmania) *ዘ ሞላኪውላር ባሎጂ ኦፍ ኢንሰክት ዲዚዝ ቬክተርስ (The Molecular Biology of Insect Disease Vectors)*: 78: 112-120

5. ባውም ኤም (Baum M)፣ ደ ካስትሮ ኤኤ (de Castro EA)፣ ፒንቶ ኤምሲ (Pinto MC)፣ ጎውላርት ቲኤም (Goulart TM)፣ ባውራ ደብሊው (Baura W) እና ሌሎች 2015፡- በብራዚል ውስጥ የአሸባ ትንኞች የተመገቡትን የደም ምንጭ በሞለኪውላር ዘዴ መለየት (Molecular detection of the blood meal source of sand flies in Brazil) *አክታ ትሮፒካ (Acta Tropica)*: 143: 8-12

6. ቤላን ኤ (Belen A)፣ አልተን ቢ (Alten B) እና አይተኪን ኤ (Aytekin A) 2004፡- በከፍታ ልዩነት ምክንያት በ*Phlebotomus papatasi* ዝርያዎች ላይ የሚታይ የስነ-ቅርጽ እና የሞለኪውላር ባህሪያት ልዩነት (Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations) *ሜዲካል ኤንድ ቬትሪካሪ ኢንቶሞሎጂ (Medical and Veterinary Entomology)*: 18(4): 343-350

7. ባታቻርያ ጆ (Bhattacharya J)፣ ቻንድራ ጂ (Chandra G) እና ሃቲ ኤኬ (Hati AK) 1991፡- የላሽማኒያ ዶኖቫኒ (*Leishmania Donovanii*) ፕሮማስቲቲቶችን (promastigotes) በቅዝቃዜ ለማቆየት የሚረዳ ቀላል ዘዴ (A simple method for cryopreservation of *Leishmania donovani* promastigotes) *ኢንዲያን ጆርናል ኦፍ ሜዲካል ሪሰርች (Indian Journal of Medical Research)*: 93: 245-6

8. ካሊንደሪ ኤልጂ (Caligiuri LG)፣ ሳንዶቫል ኤኤ (Sandoval AE)፣ ሚራንዳ ጂሲ (Miranda JC)፣ ፔሶአ ፋ (Pessoa FA)፣ ሳንቲኒ ኤምኤስ (Santini MS) እና ሌሎች 2019፡- ለፕሊዲክ ምርመራ እንዲያመች ከከጠላ አሸባ ትንኞች የዲኤንኤ አውጣጥ ሂደትን ማሻሻል (Optimization of DNA extraction from individual sand flies for PCR amplification) *ሜተሮኒክ ኤንድ ፕሮቶኮሎች (Methods and Protocols)*: 2(2): 36

9. ካሳሪል ኤኤ (Casaril AE)፣ ደ ኢሊቪራ ኤልፒ (de Oliveira LP)፣ አሎንሶ ዲፒ (Alonso DP)፣ ደ ኢሊቪራ ኤኤፍ (de Oliveira EF)፣ ጎሜስ ባሪዮስ ኤስፒ (Gomes Barrios SP) እና ሌሎች 2017፡- ከአሸባ ትንኞች የዲኤንኤ የማውጫ ዘዴን ደረጃውን የጠበቀ ማድረግ፡- ለቀጣይ ትውልድ የዝርያ ምርመራ ውሎ (Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing) *ኤክስፔሪሜንታል ፓራሳይቶሎጂ (Experimental Parasitology)*: 177: 66-72

10. ካስታላኔሊ ኤምኤ (Castalaneli MA)፣ ሴቨርትሰን ዲኤል (Severtson DL)፣ ብሩምሌይ ሲጆ (Brumley CJ)፣ ስዚቶ ኤ (Szito A)፣ ፎቲት አርጂ (Footitt RG) እና ሌሎች 2010፡- ለከፍተኛ እና ለሌሎች መግጠሚያ ላላቸው እንስሳት ፈጣን እና አካልን የማያጠፋ የዲኤንኤ አውጣጥ ዘዴ (A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods) *ጆርናል ኦፍ ኤዥራፓ-ፓሲፊክ ኢንቶሞሎጂ (Journal of Asia-Pacific Entomology)*: 13(3): 243-248

11. ሰርኬይራ ኤንኤል (Cerqueira NL) 1943፡- ጥቃቅን ነፍሳትን በአገሊ መነጽር መስታወት ላይ ለመስካት የሚያገለግል አዲስ ዘዴ (Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâmina) *ሜሞሪያስ ዶ ኢንስቲቲውዮ አዝዋልዶ ከ-ክ (Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)*: (39): 37-41

12. ቫሬል አርኤን (Charrel RN)፣ ጋሊያን ፒ (Gallian P)፣ ኖቫር-ማሪ ጆኤም (Navarro-Mari JM)፣ ኒኮሌቲ ኤል (Nicoletti L)፣ ፓፓ ኤ (Papa A) እና ሌሎች 2005፡- በአውሮፓ ውስጥ የቶስካና ቫይረስ ድንገተኛ መከሰት (Emergence of Toscana virus in Europe) *ኢሜርጂንግ ኢንፌክሽን ዲዚዝስ (Emerging Infectious Diseases)*: 11(11): 1657-63

13. ቻስኮፖሎ ኤ (Chaskopoulou A)፣ ጃይንትሲስ አይኤ (Giantsis IA)፣ ደሚር ኤስ (Demir S) እና ቦን ኤምሲ (Bon MC) 2016፡- በቴላሎኒኪ ሜትሮፖሊታን አካባቢ የሚገኙ የአሸባ ትንኞች ዝርያ ስብጥር፣ መደበኛ የእንቅስቃሴ ንድፍ እና የተመገቡት ደም ትንተና (Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations in Thessaloniki) *አክታ ትሮፒካ (Acta Tropica)*: 158: 170-176

14. ቸን ኤች (Chen H)፣ ራንጋሳሚ ኤም (Rangasamy M)፣ ታን ኤስዋይ (Tan SY)፣ ዋንግ ኤች (Wang H) እና ሲግፍሪድ ቢዲ (Siegfried BD) 2010፡- የበቆሎ ስር ተባይ ጥንዚዛዎች ላይ ሙሉ ዲኤንኤ ለማውጣት የሚያገለግሉ አምስት ዘዴዎች ግምገማ (Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles) *PLoS One*: 5(8): e11963

15. ዴፓኪት ጆ (Depaquit J)፣ ግራንዳም ኤም (Grandadam M)፣ ፋክ ኤፍ (Fouque F)፣ አንድሪ ፒኤ (Andry PE) እና ፔይሬፊት ሲ (Peyrefitte C) 2010፡- በአውሮፓ ውስጥ በአሸባ ትንኞች የሚተላለፉ ቫይረሶች፡- ክለሳ (Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review) *ዩሮሰርቬይሽን (Eurosurveillance)*: 15(10): 19507

16. ዳይመንድ ኤልኤስ (Diamond LS) እና ሄርማን ሲኤም (Herman CM) 1954፡- በከፍተኛ ዝይ የአጥንት መቅረብ ውስጥ የሚታዩ ትራይፓኖሶምስ ግጥምሽ (Incidence of Trypanosomes in the Canada Goose as revealed by bone marrow culture) *ጆርናል ኦፍ ፓራሳይቶሎጂ (Journal of Parasitology)*: 40(2): 195-202

17. ዲንግ ኤች (Ding H)፣ ቶርኖ ኤም (Torno M)፣ ቮንግፋይሎት ኬ (Vongphayloth K)፣ ንግ ጂ (Ng G)፣ ታን ዲ (Tan D) እና ሌሎች 2025፡- በግልጽ የታዩ ግን ያልተሰተዋሉ፡- በሲንጋፖር የአሸባ ትንኞች መገኘት እና ለአዲስ ሳይንሳዊ እውቅና የበቆ አራት ዝርያዎች መግለጫ (Hidden in plain sight: discovery of sand flies in Singapore and description of four species new to science) *ፓራሳይትስ ኤንድ ቬክተርስ (Parasites & Vectors)*: 18(1): 402

18. ኡስ-ሴቲ ኤን (Es-Sette N)፣ አጃውድ ኤም (Ajaoud M)፣ ቢቫውድ ኤል (Bichaud L)፣ ሃምዲ ኤስ (Hamdi S)፣ መሉኪ ኤፍ (Mellouki F) እና ሌሎች 2014፡- *Phlebotomus sergenti* በሞሮኮ ውስጥ ለላይሽማኒያ ትሮፒካ (*Leishmania tropica*) እና ለቶስካና ቫይረስ የጋራ አስተላላፊ መሆኑ (Phlebotomus sergenti a common vector of Leishmania tropica and Toscana virus in Morocco) *ጆርናል አፍ ቬክተር ቦርን ዲዚዝስ (Journal of Vector Borne Diseases)*: 51(2): 86-90

19. ፋቭሬት ሲ (Favret C) 2005፡- ለአፊድ ነፍሳት የሚያገለግል አዲስ አካልን የማያጠፋ የዲኤንኤ አወጣጥ እና ናሙናን የማጥራት ቴክኒክ (A new non-destructive DNA extraction and specimen clearing technique for aphids) *ፕሮሲዲንግስ አፍ ዘ ኢንቶሞሎጂካል ሶሳይቲ አፍ ቀሽንግተን (Proceedings of the Entomological Society of Washington)*: 107(2): 469-470

20. ጋላቲ ኢኤቢ (Galati EAB) 2018፡- ፍሊቡቶሚኔ (Diptera, Psychodidae)፡- የአዋቂ ትንቹች ምደባ፡ ስነ-ቅርጽ እና መለያዎች (Phlebotominae: Classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa) በ"በራሲያን ሳንድ ፍላይስ" መጽሐፍ ውስጥ፡ ገጽ 9-212

21. ጋላቲ ኢኤቢ (Galati EAB)፣ ደ አንድራዴ ኤጄ (de Andrade AJ)፣ ፐሮቪን ኤፍ (Perveen F)፣ ሎየር ኤም (Loyer M)፣ ቮንግፋይሎት ኬ (Vongphayloth K) እና ሌሎች 2025፡- የዓለም የአሸዋ ትንቹች (Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) of the world) *ፓራሳይትስ ኤንድ ቬክተርስ (Parasites & Vectors)*: 18(1): 220

22. ጋላቲ ኢኤቢ (Galati EAB)፣ ጋልቪስ-ኦቫሎስ ኤፍ (Galvis-Ovallos F)፣ ሎየር ፒ (Lawyer P)፣ ሌገፔ ኤን (Leger N) እና ዴፓኪት ጄ (Depaquit J) 2017፡- ለአሸዋ ትንቹች መግለጫ የሚያገለግሉ ባህሪዎች እና ቃላቶች የተብራራ መመሪያ (An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae)። *ፓራሳይት (Parasite)*: 24: 26

23. ጋሪፒ ቴ (Garipey T)፣ ኩሊማን ዩ (Kuhlmann U)፣ ጊሎት ሲ (Gillott C) እና ኤርላንድስን ኤም (Erlandson M) 2007፡- ፓራሳይቶይድስ፡ አዳኞች እና ፒሲአር፡- በመግጠሚያ ላላቸው እንስሳት ባየሎጂያዊ ቁጥጥር ውስጥ የሞለኩላር መለያዎች አጠቃቀም (Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods) *ጆርናል አፍ አፕላይድ ኢንቶሞሎጂ (Journal of Applied Entomology)*: 131(4): 225-240

24. ጃይንትሲስ አይኤ (Giantsis IA)፣ ቻስኮፖሎ ኤ (Chaskopoulou A) እና ቦን ኤምሲ (Bon MC) 2016፡- ማይልድ-ቪክቶላይሲስ፡- ለአሸዋ ትንቹች እና ለወባ ትንቹች የሚያገለግል አካልን የማያጠፋ የዲኤንኤ አወጣጥ ዘዴ (Mild-Vectolysis: A nondestructive DNA extraction method for vouchering sand flies and mosquitoes) *ጆርናል አፍ ሜዲካል ኢንቶሞሎጂ (Journal of Medical Entomology)*: 53(3): 692-695

25. ጊድዋኒ ኬ (Gidwani K)፣ ፒካዶ ኤ (Picado A)፣ ሪጃል ኤስ (Rijal S)፣ ሲንግ ኤስፒ (Singh SP)፣ ሮይ ኤል (Roy L) እና ሌሎች 2011፡- በህንድ እና ኔፓል የቪሲራል ሊቮሽማኒያሲስን ለመከላከል የሚያገለግሉ አንበሮችን ለመገምገም የአሸዋ ትንቹን የደም ምርመራ ምልክቶችን መጠቀም (Serological markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis) *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 5(9): e1296

26. ጊልበርት ኤምቲፒ (Gilbert MTP)፣ ሙር ደብሊው (Moore W)፣ ማልቺዮር ኤል (Melchior L) እና ወርቤይ ኤም (Worobey M) 2007፡- በሙዚየም ውስጥ ከሚገኙ ደረቅ ጥንዚዛዎች ላይ ውጫዊ አካላቸውን ሳይጎዱ ዲኤንኤ የማውጣት ዘዴ (DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage) *PLoS One*: 2(3): e272

27. ጆርዳኒ ቢኤፍ (Giordani BF)፣ አንድራዴ ኤጄ (Andrade AJ)፣ ጋላቲ ኢኤቢ (Galati EAB) እና ጉርጌል-ጎንካልቪስ አር (Gurgel-Goncalves R) 2017፡- በሉዝማያ (*Lutzomyia*) ንዑስ ወገን ውስጥ ትንቹችን ለመለየት የከንፍ ጂኦሜትሪክ ሞርፎሜትሪክ ያለው ሚና (The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*) *ሜዲካል ኤንድ ቬተርነሪ ኢንቶሞሎጂ (Medical and Veterinary Entomology)*: 31(4): 373-380

28. ጉዝማን-ላራልዴ ኤጄ (Guzmán-Larraalde AJ)፣ ሱኡስቲ-ድዙል ኤፒ (Suaste-Dzul AP)፣ ጋሎ ኤ (Gallou A) እና ፔኛ-ካራሎ ኬኤይ (Peña-Carrillo KI) 2017፡- አካልን የማያጠፉ ስድስት ዘዴዎችን በመጠቀም ከጥቃቅን ነፍሳት ዲኤንኤ ማግኘት (DNA recovery from microhymenoptera using six non-destructive methodologies) *ጂኖም (Genome)*: 60(1): 85-91

29. ሃጂባባይ ኤም (Hajibabaei M)፣ ደዋርድ ደአር (DeWaard JR)፣ ኢቫኖቫ ኤንቪ (Ivanova NV)፣ ራትናሲንግሃም ኤስ (Ratnasingham S) እና ሌሎች 2005፡- ከፍተኛ መጠን ያለው የዲኤንኤ ባርኮድ ለማዘጋጀት ወሳኝ የሆኑ ነጥቦች (Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes)። *ፊሎሶፊካል ትራንዛክሽንስ አፍ ዘ ሮያል ሶሳይቲ ቢ (Philosophical Transactions of the Royal Society B)*: 360(1462): 1959-1967

30. ሃዋስ ኤን (Haouas N)፣ ፔሶን ቢ (Pesson B)፣ ቡዳቦስ አር (Boudabous R)፣ ዴዴት ጆፒ (Dedet JP) እና ሌሎች 2007፡- በትንቹች ውስጥ ያለን የደም ትንተና በመጠቀም የሌቮሽማኒያ በሽታ ተሽከሚ እንስሳትን ለመለየት የሚያስችል የሞለኩላር መሣሪያ ማዘጋጀት (Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis)። *አሜሪካን ጆርናል አፍ ትሮፒካል ሜዲሲን ኤንድ ሃይጂን (American Journal of Tropical Medicine and Hygiene)*: 77(6): 1054-1059

31. ላቫክቫ ኬ (Hlavackova K)፣ ድቮራክ ቪ (Dvorak V)፣ ቻስኮፖሎ ኤ (Chaskopoulou A)፣ ቮልፍ ፒ (Volf P) እና ሃላዳ ፒ (Halada P) 2019፡- በነፍሳት ውስጥ የተመገቡትን የደም ዓይነት ለመለየት የሚያስችል አዲስ ማልዲቶፍ ኤም ኤ ስ (MALDI-TOF MS) ላይ የተመሠረተ ዘዴ (A novel MALDI-TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors) *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 13(9): e0007669

32. ሀሙር ኤች (Huemer H)፣ ፕሩዶም ጄ (Prudhomme J)፣ አማሮ ኤፍ (Amaro F)፣ ባክሎቲ ኤ (Baklouti A) እና ሌሎች 2017፡- በአሸዋ ትንቹን በሚተላለፉ ፍሊቮቫይረሶች ላይ ለሚደረጉ ጥናቶች ተግባራዊ መመሪያ፡- ክፍል 2 (Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: Part II: fieldwork and virological screening) *ቬክተር-ቦርን ኤንድ ዙፕራኒክ ዲዚዝስ (Vector-Borne and Zoonotic Diseases)*: 17(1): 81-90

33. ጃንካሮቫ ኤም (Jancarova M)፣ ፖላንስካ ኤን (Polanska N)፣ ቲሰን ኤ (Thiesson A)፣ አርኖድ ኤፍ (Arnaud F) እና ሌሎች 2025፡- የተለያዩ የአሸዋ ትንቹን ዝርያዎች ለቶስካና ቫይረስ ያላቸው ተጋላጭነት (Susceptibility of diverse sand fly species to Toscana virus) *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 19(5): e0013031

34. ካፕ ጄዲ (Kapp JD)፣ ግሪን አርኪ (Green RE) እና ሻፒር ቢ (Shapiro B) 2021፡- ለመደበኛ ዲኤንኤ ምርመራ የተመቻቸ ፈጣን እና ቀልጣፋ የጂኖሚክ ላይብሪ ገጣጅ ዘዴ (A fast and efficient single-stranded genomic library preparation method optimized for ancient DNA) *ጆርናል አፍ ሄራዲቲ (Journal of Heredity)*: 112(3): 241-249

35. ኪሊክ-ኬንድሪክ አር (Killick-Kendrick R)፣ ማሮሊ ኤም (Maroli M) እና ኪሊክ-ኬንድሪክ ኤም (Killick-Kendrick M) 1991፡- የአሸዋ ትንቹችን በላብራቶሪ ስለማላመድ የተጻፉ ጽሑፎች ዝርዝር (Bibliography of the colonization of phlebotomine sandflies) *ፓራሲቶሎጂ (Parassitologia)*: 33 (suppl.): 321-333

36. ሎሮ ፕ (Lawyer P)፣ ኪሊክ-ኪንድሪክ ኤም (Killick-Kendrick M)፣ ሮውላንድ ቲ (Rowland T)፣ ሮውተን ኢ (Rowton E) እና ቮልፍ ፕ (Volf P) 2017፡- የአሸዋ ትንኞችን በላብራቶሪ ውስጥ ማላመድ እና በብዛት ማርባት (Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae)) *ፓራሳይት (Parasite)*: 24: 42

37. ሌገፍ ኤን (Léger N)፣ ፔሶን ቢ (Pesson B) እና ማዲሎ-ሌብሎንድ ጂ (Madulo-Leblond G) 1986፡- የግሪክ አሸዋ ትንኞች፡- 1ኛ ክፍል (Les phlébotomes de Grèce : 1ère partie) በተለፉት ደብዳቤ ፓዮሎጂ ኤግዞቲክ (*Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*): 79: 386-397

38. ሌገፍ ኤን (Léger N)፣ ፔሶን ቢ (Pesson B) እና ማዲሎ-ሌብሎንድ ጂ (Madulo-Leblond G) 1986፡- የግሪክ አሸዋ ትንኞች፡- 2ኛ ክፍል (Les phlébotomes de Grèce : 2ème partie) በተለፉት ደብዳቤ ፓዮሎጂ ኤግዞቲክ (*Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*): 79: 514-524

39. ሊዮንል ጄኤኤፍ (Leonel JAF)፣ ቪዮቲ ጂ (Viotti G)፣ አልቪስ ኤምኤል (Alves ML)፣ ዳ ሲልቫ ዲቲ (da Silva DT) እና ሌሎች 2020፡- ከነጠላ አሸዋ ትንኞች ዲኤንኤ ማውጣት፡- የተሻለ ውጤት የሚሰጠው የትኛው ዘዴ ነው? (DNA extraction from individual Phlebotomine sand flies specimens: Which is the method with better results?) *ኤክስፕሪሜንታል ፓራሳይቶሎጂ (Experimental Parasitology)*: 218: 107981

40. ሌስቲኖቫ ቲ (Lestoinova T)፣ ሮውሳቫ አይ (Rohousova I)፣ ሲማ ኤም (Sima M)፣ ደ ሲሊቪያ ሲኤይ (de Oliveira CI) እና ቮልፍ ፕ (Volf P) 2017፡- ስለ አሸዋ ትንኝ ምራቅ ግንዛቤዎች፡- በትንኞች፣ በአስተናጋጆች (HOST) እና በሌሎች ማከከል ያለው የደም አመጋገብ እና የኢሚዩኖሎጂ መስተጋብር (Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions) *PLoS Neglected Tropical Diseases*: 11(7): e0005600

41. ሊንሃርድ ኤ (Lienhard A) እና ሻራር ኤስ (Schaffer S) 2019፡- ስውር የሆነውን ማውጣት፡- ጥቃቅን ነፍሳት ውስጥ ያለውን ዲኤንኤ በጥራት ማግኘት ፈታኝ ሥራ ነው (Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods):: *PeerJ*: 7: e6753

42. ሎዛኖ-ሳርዳኔታ ዋይኤን (Lozano-Sardaneta YN)፣ ሚኬራ-ፓቼኮ አኤፍ (Mikery-Pacheco OF)፣ ሁዌርታ ኤች (Huerta H) እና ሌሎች 2025፡- በሜክሲኮ ውስጥ የሌሽማንያሲስ አስተላላፊ የሆኑ የአሸዋ ትንኝ ዝርያዎችን ለመለየት የክንፍ ጂኦሜትሪክ ሞርፎሜትሪክ ውጤታማ ነው (Wing geometric morphometrics is effective to separate sand fly species related with leishmaniasis transmission in Mexico) *አክታ ትሮፒካ (Acta Tropica)*: 262: 107523

43. ማንደሪዮሊ ኤም (Mandrioli M)። 2008፡- የነፍሳት ስብስቦች እና የዲኤንኤ ትንተና፡- ስብስቦችን እንዴት ማስተዳደር ይቻላል? (Insect collections and DNA analyses: how to manage collections?) *መዘየም ማኔጅመንት ኤንድ ኩሬተርሺፕ (Museum Management and Curatorship)*: 23(2): 193-199

44. ማርሊ ኤም (Maroli M)፣ ፌሊቺንጂሊ ኤምዲ (Felicciangeli MD)፣ ቢቫውድ ኤል (Bichaud L)፣ ሻራል አርኤን (Charrel RN) እና ግራዶኒ ኤል (Gradoni L) 2013፡- አሸዋ ትንኞች እና የሌሽማንያሲስ እንዲሁም የሌሎች የህዝብ ጤና ችግር የሆኑ በሽታዎች ስርጭት (Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases) *ሜዲካል ኤንድ ቪታሊን ስራተርሺፕ (Medical and Veterinary Entomology)*: 27(2): 123-47

45. ማርኪንዳዲ (Marquina D)፣ ቡክከኤ ኤም (Buczek M)፣ ሮንኩዊስት ኤፍ (Ronquist F) እና ሉካሲክ ፕ (Lukasik P) 2021፡- የአልኮል መጠን በነፍሳት ስነ-

ቅርጽ እና በሞለኩላር ጥበቃ ላይ ያለው ተፅዕኖ (The effect of ethanol concentration on the morphological and molecular preservation of insects) *PeerJ*: 9: e10799

46. ማቲስ ኤ (Mathis A)፣ ዴፓኪት ጂ (Depaquit J)፣ ድቮራክ ቪ (Dvorak V)፣ ቱተን ኤች (Tuten H)፣ ባኑልስ ኤኤል (Banuls AL) እና ሌሎች 2015፡- በአንድ የማልዲዮፍ ኤምኤስ (MALDI-TOF MS) ዋቢ መረጃ ቋት እና ሁለት የማስ ስፔክትሮሜትር ስርዓቶችን በመጠቀም አሸዋ ትንኞችን መለየት (Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems) *ፓራሳይትስ ኤንድ ቪክተርስ (Parasites & Vectors)*: 8: 266

47. ሜካርኒያ ኤን (Mekarnia N)፣ ቤናላል ኬኢ (Benallal KE)፣ ሳድሎቫ ጂ (Sadlova J)፣ ቮይትኮቫ ቢ (Vojtkova B) እና ሌሎች 2024፡- የፍሊቦቶመስ ፓፓታሲ (*Phlebotomus papatasi*) በሌሽማንያ ሜጆር (*Leishmania major* Mon-25) ተላምዶ የመኖር ብቃት፣ ተላላፊነት እና የመድኃኒት መቋቋም ባህሪ ላይ ያለው ተፅዕኖ (Effect of *Phlebotomus papatasi* on the fitness, infectivity and antimony-resistance phenotype of *Leishmania major*) *ኢንተርናሽናል ጆርናል ፎር ፓራሳይቶሎጂ - ድረግስ ኤንድ ድረግ ሪሲስታንስ (International Journal for Parasitology – Drugs and Drug resistance)*: 25: 100554

48. ሚሊጋን ቢጂ (Milligan BG) 1998፡- ሙሉ የዲኤንኤ አወጣጥ (Total DNA isolation)፣ በሆልዘል ኤር (Hoelzel AR) አዘጋጅነት "የስብስቦች ሞለኩላር ጂኔቲክ ትንተና፡- ተግባራዊ አቀራረብ" (Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach) በሚለው መጽሐፍ ውስጥ። አክሲዮርድ ዩኒቨርሲቲ ፕረስ (Oxford University Press)፡- አክሲዮርድ

49. ሞሊና አር (Molina R)፣ ጂሜኔዝ ኤም (Jiménez M)፣ አልቫር ጂ (Alvar J)፣ ጎንጋሌዝ ኢ (González E) እና ሌሎች 2017፡- በአሸዋ ትንኝ ምርምር ውስጥ የሚተገበሩ ዘዴዎች (Methods in sand fly research) ዩኒቨርሲቲ ኦፍ አልካላ፣ ማድሪድ

50. ሞርጌ ደብሊውጂ (Murphy WJ)፣ ኢይዚሪክ ኢ (Eizirik E)፣ ኦብሪያን ኤስጂ (O'Brien SJ)፣ ማድሰን ኦ (Madsen O) እና ሌሎች 2001፡- የቀደምት አጥቢ እንስሳት ስርጭትን በቢገርያን ፊሎጂኔቲክስ መፍታት (Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics):: *ሳይንስ (Science)*: 294(5550): 2348-51

51. ናሲፍ-ፒሜንታ አር (Nacif-Pimenta R)፣ ፒንቶ ኤልሲ (Pinto LC)፣ ቮልፎቫ ቪ (Volfova V)፣ ቮልፍ ፕ (Volf P)፣ ፒሜንታ ፒኤፍፒ (Pimenta PFP) እና ሴኩንዲኖ ኤንኤፍሲ (Secundino NFC) 2020፡- የሌሽማንያሲስ አስተላላፊ በሆኑ የአሸዋ ትንኞች የምራቅ አጠዎች ላይ የሚታዩ የተቀራረቡ እና የተለዩ ስነ-ቅርጫ ገጽታዎች፡- የአናቶሚ እና የአልትራስትራክቸር ጥናት (Conserved and distinct morphological aspects of the salivary glands of sand fly vectors of leishmaniasis: an anatomical and ultrastructural study) *ፓራሳይትስ ኤንድ ቪክተርስ (Parasites & Vectors)*: 13(1): 441

52. ኑሃውስ ቢ (Neuhaus B)፣ ሽሚድ ቲ (Schmid T) እና ሪዴል ጂ (Riedel J) 2017፡- የአገሉ መነጻር መስታወት (Slide) ስብስቦች አስተዳደር እና ጥናት፡- ማከማቻ፣ መረጃ ማደራጀት፣ መበላሸት፣ የእድሳት ሂደቶች እና አጠቃላይ ምክራ-ሐሳቦች (Collection management and study of microscope slides: Storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations) *ዙታክሳ (Zootaxa)*: 4322(1): 1-173

53. ኒው ቲአር (New TR) 1974፡- ፕሰፕቲራ (Pscoptera)፣ የብሪታንያ ነፍሳትን ለመለየት የሚያገለግሉ መመሪያዎች (Handbooks for Identification of British Insects) ቅጽ 1 ለንደን፡- የለንደን ሮያል ኢንቶሞሎጂካል ሶሳይቲ (Royal Entomological Society of London) 102 ገጽ

54. ፔራዝ-ሩይዝ ኤም (Perez-Ruiz M)፣ ኮላኦ ኤስ (Collao X)፣ ናቫሮ-ማሪ ጂኤም (Navarro-Mari JM) እና ቴኖሪዮ ኤ (Tenorio A) 2007፡- የቶስካና

ቫይረስን ለመለየት የሚያስችል የሬል-ታይም ፕሲኦር ምርመራ (Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus) ጆርናል ኦፍ ክሊኒካል ቫይሮሎጂ (Journal of Clinical Virology): 39(4): 276-81

55 ፖርኮ ዲ (Porco D)፣ ሮውጆሪ ኦር (Rougerie R)፣ ዲሃርቪንግ ኤል (Deharveng L) እና ሄበርት ፕ (Hebert P)። 2010፡- ከፍተኛ መጠን ባለው የሥራ ሂደት ውስጥ ለጥቃቅንና ለስላሳ አካል ላላቸው መገጣጠሚያ ላላቸው እንስሳት (Arthropods) አካልን የማያጠፋ የዲኤንኤ አወጣጥ እና የናሙና ጥበቃን ማጣመር፡- የኮሌምቦላ (Collembola) ምሳሌ (Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola) ሞለኪውላር ኢኮሎጂ ሪሶርስስ (Molecular Ecology Resources): 10(6): 942-945

56. ፕሩዶም ጆ (Prudhomme J)፣ ካሳን ሲ (Cassan C)፣ ሂዶ ኤም (Hide M)፣ ቶቲ ሲ (Toty C)፣ ራሆላ ኤን (Rahola N) እና ሌሎች 2016፡- በፊረንሳይ ሮክደር አካባቢ የሚገኙ የፍሌቦተመስ አርያሲ - ዲፕተራ ሳይኮዲዴ (Phlebotomus ariasi) , Diptera: Psychodidae) ከገፎች ስነ-ምህዳራዊ እና ስነ-ቅርጽ ልዩነቶች፡- የጂኦሜትሪክ ሞርፎሎጂካል አቀራረብ (Ecology and morphological variations in wings of Phlebotomus ariasi (Diptera: Psychodidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach) ፓራሳይትስ ኤንድ ቪክተርስ (Parasites & Vectors): 9(1): 578

57. ፕሩዶም ጆ (Prudhomme J)፣ ጉናይ ኤፍ (Gunay F)፣ ራሆላ ኤን (Rahola N)፣ ኦዋናይሚ ኤፍ (Ouanaimi F) እና ሌሎች 2012፡- በሞሮኮ የአትላስ ተራሮች በሚገኙ የፍሌቦተመስ ፓፓታሲ (Phlebotomus papatasi) ዝርያዎች ላይ የሚታይ የክንፍ መጠንና ቅርጽ ልዩነት (Wing size and shape variation of Phlebotomus papatasi populations in Morocco) ጆርናል ኦፍ ቪክተርስ ኢኮሎጂ (Journal of Vector Ecology): 37(1): 137-47

58. ፕሩዶም ጆ (Prudhomme J)፣ ቶቲ ሲ (Toty C)፣ ካሳፕ ኦኤ (Kasap OE)፣ ራሆላ ኤን (Rahola N)፣ ቨርግኔስ ቢ (Vergnes B)፣ ማያ ሲ (Maia C)፣ ካምፒኖ ኤል (Campino L)፣ አንቶኒዮ ኤም (Antoniou M)፣ ጂሜኔዝ ኤም (Jimenez M)፣ ሞሊና ስር (Molina R)፣ ካኔት ኤ (Cannet A)፣ አልተን ቢ (Alten B)፣ ሴራኖ ዲ (Sereno D) እና ባኑልስ ኤል (Banuls AL) 2015፡- በሜዲትራኒያን አካባቢ የላይሽማንያ ኢንፋንታም (Leishmania infantum) አስተላላፊ በሆነው ፍሌቦተመስ አርያሲ ቶናይር (Phlebotomus ariasi Tonnoir) ላይ ለሚደረጉ ዘርፈ-በዙ የዘረመል ጥናቶች አዲስ ማይክሮሳተላይት መለያዎች (New microsatellite markers for multi-scale genetic studies on Phlebotomus ariasi Tonnoir, vector of Leishmania infantum in the Mediterranean area) አክታ ትሮፒካ (Acta Tropica): 142: 79-85

59. ፕሩዶም ጆ (Prudhomme J)፣ ቪሎ ኤ (Velo E)፣ ቢኖ ኤስ (Bino S)፣ ካድሪያጅ ፒ (Kadriaj P)፣ መርሲኒ ኬ (Mersini K)፣ ጉናይ ኤፍ (Gunay F) እና አልተን ቢ (Alten B) 2019፡- በአውሮፓ ለመጀመሪያ ጊዜ በተመዘገበበት የአልባኒያ ክልል ውስጥ የሚገኙ የኤደስ አልቦቲከስ ዲፕተራ ኩሊሲዴ (Aedes albopictus , Diptera, Culicidae) ከባህር ጠለል በላይ የመሬት ከፍታ በከንፍ ስነ-ቅርጽ ላይ የሚያስከትሉት ልዩነት (Altitudinal variations in wing morphology of Aedes albopictus (Diptera, Culicidae) in Albania, the region where it was first recorded in Europe) ፓራሳይት (Parasite): 26: 55

60. ሮውሊንስ ዲጂ (Rawlins DJ) 1992፡- የብርሃን አጉሊ መነጽር፡- ባዩ-ቴክኒኮችን ማስተዋወቅ (Light Microscopy: An Introduction to Biotechniques) አክስፎርድ፡ ባዩስ ሳይንቲክስ ፕሮግራም፡ 143 ገጽ

61 ሬዲ ፒዲ (Ready PD) 2013፡- የበቸታ አምጪ ተህዋስያን አስተላላፊ የሆኑት የፍሌቦተሚን አሸዋ ትንኞች ባዮሎጂ (Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents) አንዩዋል ሪቪው ኦፍ ኢንቶሎጂ (Annual Review of Entomology): 58: 227-50

62 ሮልፍ ኤፍጆ (Rohlf FJ) እና ሰላይስ ዲ (Slice D) 1990፡- የገጥሞችን (Landmarks) ትክክለኛ ተደራቢነት ለሚያገለግሉ የፕሮክራስትስ ዘዴ ቅጥያዎች (Extensions of the Procrustes method for the optimal

superimposition of landmarks) ሲስተማቲክ ዞኦሎጂ (Systematic Zoology): 39(1): 40-59

63. ሮውሊ ዲኤል (Rowley DL)፣ ኮዲንግተን ጆኤ (Coddington JA)፣ ጌትስ ኤምደብሊው (Gates MW)፣ ኖርቦም ኤል (Norrbom AL)፣ ኦቻኦ አርኤ (Ochoa RA)፣ ቫንደንበርግ ኤንጆ (Vandenberg NJ) እና ግሪንስተን ኤምኤች (Greenstone MH) 2007፡- የዲኤንኤ ባርኮድን (DNA-barcoded) ለናሙናዎች ማስረጃነት መጠቀም፡- አካልን የማያጠፋ ወጣት መመሪያ በዩብስ ለሚኖሩ መገጣጠሚያ ላላቸው እንስሳት (Arthropods) ያለው ወጤታማነት (Vouchering DNA-barcoded specimens: Test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods) ሞለኪውላር ኢኮሎጂ ኖትስ (Molecular Ecology Notes): 7(6): 915-924

64. ሳቢዮ ፒቢ (Sábio PB)፣ አንድራዴ ኤጆ (Andrade AJ) እና ጋላቲ ኤሌቢ (Galati EAB) 2014፡- በ"ሻኖን ኮምፕሌክስ" (Shannoni complex) ውስጥ የተካተቱ የአንዳንድ ዝርያዎች ታክሶኖሚያዊ ደረጃ ግምገማ እና አዲስ የሳቲሮማያ (Psathyromyia -Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) ዝርያ መግለጫ (Assessment of the taxonomic status of some species included in the Shannoni complex, with the description of a new species of Psathyromyia) ጆርናል ኦፍ ሜዲካል ኢንቶሎጂ (Journal of Medical Entomology): 51(2): 331-341

65. ሳድሎቫ ጆ (Sadlova J)፣ ዮ ኤም (Yeo M)፣ ሴብሎቫ ቪ (Seblova V)፣ ሌዊስ ኤምዲ (Lewis MD)፣ ማውሪሲዮ ኤይ (Mauricio I)፣ ቮልፍ ፒ (Volf P) እና ማይልስ ኤምኤ (Miles MA) 2011፡- በአሸዋ ትንኝ (sand fly) ውስጥ በመጀመሪያው የአድገት ደረጃ ላይ ያሉ የላይሽማንያ ዶኖቫኒ (Leishmania donovani) ፍሌረሲንት ዲቃላዎችን በምስል ማሳየት (Visualisation of Leishmania donovani fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector) ፕሎዎን (PLoS One): 6(5): e19851

66 ሳልስ ኬ (Sales K)፣ ሚራንዳ ዲኤላ (Miranda DEO)፣ ዳ ሲልቫ ኤፍጆ (da Silva FJ)፣ ኦትራንቶ ዲ (Otranto D)፣ ፊጊዬራ ኤል (Figueredo LA) እና ዳንታስ-ቶሪስ ኤፍ (Dantas-Torres F) 2020፡- በተለያዩ የማከማቻ ጊዜያት እና የማቆያ ዘዴዎች በአሸዋ ትንኝ የዲኤንኤ (DNA) ከምችት እና ጥራት ላይ ያላቸው ተጽዕኖ ግምገማ (Evaluation of different storage times and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity) ፓራሳይትስ ኤንድ ቪክተርስ (Parasites & Vectors): 13(1): 399

67. ሳልስ ኬጂ (Sales KG)፣ ኮስታ ፒኤል (Costa PL)፣ ደ ሞራይስ አርሲ (de Moraes RC)፣ ኦትራንቶ ዲ (Otranto D)፣ ብራንዳኦ-ፊልዮ ኤስፒ (Brandao-Filho SP)፣ ካቫልካንቲ ኤምደፒ (Cavalcanti Mde P) እና ዳንታስ-ቶሪስ ኤፍ (Dantas-Torres F) 2015፡- በአሸዋ ትንኞች ሆኖ ዕቃ ውስጥ የሚገኝ የደም ምግብን በ"ሬል-ታይም ፕሲኦር" (Real-time PCR) ዘዴ መለየት (Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR) ፓራሳይትስ ኤንድ ቪክተርስ (Parasites & Vectors): 8: 230

68. ሳንታ ኦፊ ኤምኤር (Sant'Anna MR)፣ ጆንስ ኤንጆ (Jones NG)፣ ሂንድላይ ጆኤ (Hindley JA)፣ ሜንዴ-ሰላ ኤኤፍ (Mendes-Sousa AF)፣ ዲሎን አርጆ (Dillon RJ)፣ ካቫልካንቲ አርኤር (Cavalcante RR)፣ አሌክሳንደር ቢ (Alexander B) እና ቤይትስ ፒኤ (Bates PA) 2008፡- በለቦራቶሪ ውስጥ በተመገቡ እና ከመስክ በተያዙ ሉትዞማያ ሎንጂፓልፒስ (Lutzomyia longipalpis) አሸዋ ትንኞች ላይ የ"ኤፍቲኤ" (FTA) የመረጃ ወረቀትን በመጠቀም የደም ምግብ መለየት እና የጥንኛ ተህዋስያን ልዩነት (Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured Lutzomyia longipalpis by PCR using FTA databasing paper) አክታ ትሮፒካ (Acta Tropica): 107(3): 230-7

69. ሴኔ ኤንኤ (Senne NA)፣ ሳንቶስ ኤቸኤ (Santos HA)፣ አራውጆ ቲአር (Araujo TR)፣ ፓውሊኖ ፒጂ (Paulino PG)፣ ሜንዶንጎ ኤልፒ (Mendonca LP)፣ ሞራይራ ኤቸቪኤስ (Moreira HVS)፣ ካሚሎ ቲኤ (Camilo TA) እና ዳ ኮስታ አንጆሎ አይ (da Costa Angelo I) 2022፡- ደም ባልመጠጡ (Non-engorged) የፍሌቦተሚን አሸዋ ትንኞች ላይ የተደረገ አስተማማኝ የጂኖሚክ ዲኤንኤ (gDNA) ወጣት ዘዴዎችን ጎጽጽራዊ አፈጻጸም (Robust comparative performance of genomic DNA extraction methods from non-engorged phlebotomine sandflies) ሜዲካል ኤንድ ቪክተርስ ኢንቶሎጂ (Medical and Veterinary Entomology): 36(2): 203-211

70 ሸው ጆጅ (Shaw JJ) 2025:- በአሜሪካ አሸዋ ትንኞች ውስጥ ስለሚከሰቱ የሌሽማንያ ኢንፌክሽኖች የምርምር ዕውቅናዎች ዳሰሳ - ሌሽማንያሲስን የሚያስተላልፉት ዝርያዎች የሰውን ደም ብቻ ተመጋቢ (Anthropophilic) ናቸው ወይስ የሰውንና ሌሎች እንስሳትን ደም ተመጋቢ (Anthrooportunists)? (A review of *Leishmania* infections in American Phlebotomine sand flies – Are those that transmit leishmaniasis anthropophilic or anthrooportunists?) *Parasite*: 32: 57

71. ቴሽ አርቢ (Tesh RB) እና ሞዲ ጂቢ (Modi GB) 1983:- በፍሌቦተመስ ፓፓታሲ (*Phlebotomus papatasi*) አሸዋ ትንኞች ውስጥ የቻንዲፑራ ቫይረስ (Chandipura virus - Rhabdoviridae: Vesiculovirus) እድገት እና በእንቁላል በኩል ወደ ሚቀጥለው ትውልድ የመተላለፍ ሂደት (Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) in *Phlebotomus papatasi*) አሜሪካን ጆርናል አፍ ትሮፒካል ሜዲሲን ኤንድ ሃይጂን (*American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*) 32(3): 621-3

72. ቶምሰን ፒኤፍ (Thomsen PF)፣ ኤሊያስ ኤስ (Elias S)፣ ጊልበርት ኤምቲፒ (Gilbert MTP)፣ ሃይሌ ጆ (Haile J)፣ ሙንች ኬ (Munch K)፣ ኩዝሚና ኤስ (Kuzmina S)፣ ፍሮዴ ዲጂ (Froese DG)፣ ሸር ኤ (Sher A)፣ ሆልዳዊይ አርኤን (Holdaway RN) እና ዊሊየምስ ኤ (Willerslev E) 2009:- አካልን ሳይጎዱ ከጥንታዊ ነፍሳት የዲኤንኤ (DNA) ናሙና መውሰድ ዘዴ (Non-destructive sampling of ancient insect DNA) *Trends in Parasitology* 24(4): e5048

73. ትሩኤት ጂኤ (Truett GE)፣ ሄገር ፒ (Heeger P)፣ ማይናት አርኤል (Mynatt RL)፣ ትሩኤት ኤስ (Truett AA)፣ ዎኪር ጆኤ (Walker JA) እና ዋርማን ኤምኤል (Warman ML) 2000:- ሙቅ ሲዲየም ሃይድሮክሳይድ እና ትሪሰ (HotSHOT) በመጠቀም ፒሲኤር (PCR) ጥራት ያለው የአይጥ ጂኖሚክ ዲኤንኤን ማዘጋጀት (Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium

hydroxide and tris (HotSHOT)) *ባዮ-ቴክኒክስ (Biotechniques)*: 29(1): 52-54


74 አፕተን ኤምኤስ (Upton MS) 1993:- በውሃ የሚሟሙ የ"ገም-ክሎራል" (Gum-chloral) ማንበሪያ ቅመሞች:- የታሪክ ዳሰሳ (Aqueous gum-chloral slide mounting media: an historical review)። *ቡሌቲን ኦፍ ኢንፎርሜሽን ላይ ላይ ስርዓት (Bulletin of Entomological Research)*: 83(2): 267-274

75. ቮልፍ ፒ (Volf P) እና ሚስኮቫ ጆ (Myskova J) 2007:- አሸዋ ትንኞች እና ሌሽማንያ:- የተገደቡ (Specific) ወይስ ልቅ (Permissive) አስተላላፊዎች (Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors) *ትራንድስ ሲን ፓራሳይቶሎጂ (Trends in Parasitology)*: 23(3): 91-92

76. ዋንግ ኪው (Wang Q) እና ዋንግ ኤክስ (Wang X) 2012:- ለፒሲኤር (PCR) ትንተና ከአንድ የ"ኪሮኖሚድ" (Chironomid) ነፍሳት ላይ ዲኤንኤ (DNA) ለማውጣት የሚያገለግሉ ዘዴዎች ገጽጽር (Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis) *ፓኪስታን ጆርናል አፍ ዙሎሎጂ (Pakistan Journal of Zoology)*: 44(2)

77. ዋንግ ዋይ (Wang Y)፣ ገሻ ዋይ (Zhao Y)፣ ቦላስ ኤ (Bollas A)፣ ዋንግ ዋይ (Wang Y) እና ኦ ኬኤፍ (Au KF) 2021:- የ"ናኖፖር" የዘረመል ቅደም ተከተል ቴክኖሎጂ (Nanopore sequencing)፣ ባዮኢንፎርማቲክስ እና ጥቅማቸው (Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications) *ኔቸር ባዮ-ቴክኖሎጂ (Nature Biotechnology)*: 39(11): 1348-1365

Cite this article as: Randrianambinintsoa FJ, Augendre L, Prudhomme J, Martinet J-P, Loyer M, Mekarnia N, Kerkoub H, Perveen FK, Huguenin A, Kariya E, Akhoundi M, De Andrade AJ, Berriatua E, Bongiorno G, Boyer S, Christodoulou V, Da Costa-Ribeiro MCV, De Souza LAF, Ding H, Dondji B, Dvořák V, Erisoz Kasap O, Galati EAB, Gállego M, Ballart C, Gouzelou S, Haddad N, Masse RS, Mekuria AH, Ivovic V, Kaczmarek S, Shahar MK, Kirstein OD, Kniha E, Kolářová I, Lincoln T, Lucanas C, Mikov O, Nov K, Özbel Y, Pesson B, Posada Lopez LC, Prasetyo DB, Rahola N, Rebollar-Tellez EA, Rodrigues BL, Roy L, Saini P, Sanjoba C, Shimabukuro PH, Siriyasatien P, Soszynska A, Sulešćo T, Sylla M, Torno M, Volf P, Vongphayloth K, Sinh Nam V, Wardhana A, Yessinou E, Zapata S, Gantier J-C & Depaquit J. 2026. Processing and mounting phlebotomine sand flies: a consensus guideline. *Parasite* xx, xx. <https://doi.org/10.1051/parasite/2026009>.

 **PARASITE** An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief: Submit your manuscript
at:

አባሪ 1፡- የባዮኬሚካል ፅንሰ ሀሳብ መሠረቶች (Appendix 1: Biochemical theoretical foundations)

ይህ ርዕሥ የሚመለከተው የአሸቆ ትንኞች አርትሮፖዶች ነው። ሆኖም ግን፣ አጠቃላይ ሐሳቡ የዝርያ ልዩታ ዘዴያቸው በውስጣዊ የሥነ-ቅርጽ (morphological) ባህሪያት ላይ ብቻ ለተመሰረተ ሌሎች በጣም የተለመዱ አርትሮፖዶችም ሊሠራ ይችላል። በአጋጣሚ፣ አንዳንድ የውስጥ አካላት በክሬል በቺቲን (chitin) የተገነቡ በመሆናቸው የአነሱ ቅርጽ ጠቃሚ መረጃ ይሰጣሉ። ለዚህ ነው የምግብ ፓምፖችን (food pumps/cibarium)፣ የዘር ማከማቻ ከርጢቶችን (spermathecae) እና ቱቦዎቻቸውን (ducts) መመልከቱ በጣም ትኩረት የሚሰጠው የሚሆነው።

ቀጥለን የምንቃኛቸውን ሁሉንም ረአጀንቶች (reagents) በተመለከተ፣ ከነፍሳት ትክለት (fixation) ደረጃ ጀምሮ እስከ ማጠናቀር (assembly) ድረስ በቀላሉ የሬዶክስ አፀግብሮት (redox - oxidation-reduction reaction) እንደምንተገብር መዘንጋት የለበትም። እኛን ሊመራን የሚገባው ጥንቃቄ ወይም ሐሳብ፣ ቀላሽ ምላሽ ሰጪ ንጥረ ነገሮች (reducing reagents) ከአክሳይድ አድራጊ (oxidizing) ረአጀንቶች ጋር አለመቀላቀል ነው።

ኤቲል አልኮል፣ ኢታኖል (Ethyl alcohol; ethanol)

ይህ ንጥረ ነገር በተለያዩ መንገዶች ጥቅም ላይ ይውላል። የአልኮል ሞለኪውሎች ከውሃ ጋር ከፍተኛ ቁርኝት (affinity) አላቸው፤ ስለዚህም ውሃ የማስወገድ (dehydrating) ባህሪ ያሳያሉ። ሆኖም ግን፣ አነስተኛ ምጥነት ያለው አልኮል (ማለትም የውሃ መጠኑ በጣም ከፍተኛ የሆነ) የኩክሊክ አሲዶችን መበላሸት ያስከትላል (ውሃ ከኩክሊክ አሲዶች ጋር አይጣጣምም)።

ነፍሳት በኢታኖል ውስጥ ሲቀመጡ ለማቆየት ብቻ ሳይሆን፣ ህብረ ህዋሳትን ለማጠንከር (to fix the tissues) ጭምር ነው። በሥነ ህብረህዋስ (histology) ውስጥ በተለምዶ ሁለት አሲዳዊ ጽንሰ-ሐሳቦችን እንሰይዛለን፡- አነስተኛ የዘልቆ መግባት መጠን (penetration rate) እና የማጠንከር መጠን (fixation rate) ናቸው። አንድ ጥሩ ማቆያ መጀመሪያ ህብረህዋሳትን ከማጠንከሩ በፊት በፍጥነት ወደ ውስጥ ዘልቆ መግባት እንዳለበት በሚገባ የታወቀ ነው። ለ 96% አልኮል፣ የዘልቆ መግባት ጠቋሚ ቁጥሩ (penetration coefficient) 1.05 ገደማ ነው (ለማጠንከር ያህል)፣ ለ 0.75% የፒክሪክ አሲድ የውሃ ውህድ የዘልቆ መግባት ጠቋሚ ቁጥሩ 0.45 ሲሆን፣ ለ 3% የፖታሲየም ዲክሮሜት ውህድ ደግሞ 1.45 ነው።

ነፍሳትን እና ሌሎች አርትሮፖዶችን በኢታኖል ውስጥ ለዘላለም ለማቆየት መፈለግ የኢንቶሞሎጂስቶች ፅኑ ፍላጎት ነው። የመስክ ስብስቦችን ለቀጣይ ጥናቶች ወይም ለወደፊት ተመራማሪዎች ለማቆየት መፈለግ አሁንም በጣም የሚከበር ሐሳብ ነው። ቢሆንም፣ ይህ ሐሳብ ለሳይቶሎጂስት (cytologist) ወይም ለሂስቶሎጂስት (histologist) የማይቻል ነው። ናሙናዎችን በማቆያ ፈሳሽ (fixative) ውስጥ ለረጅም ጊዜ ለማቆየት በመሞከር፣ በኋላ ላይ መልሶ ለመጠቀም (to rework) በተግባር የማይቻል ሊሆኑ ይችላሉ። ለዚህ ነው ከ 10 ዓመት በላይ የቆዩ ናሙናዎችን ለመጠቀም አስቸጋሪ ወይም የማይቻል የሚሆነው።

ሌላው ግምት ውስጥ መግባት ያለበት ነጥብ፣ ሊጠነከር በሚፈለገው የአርትሮፖዶ ክብደት (mass) እና በማቆያ ውህድ መጠን (volume) መካከል ያለው ጥምርታ (ratio) ነው። በሥነ-እንስሳት (zoology) ወይም በሕክምና ልምምድ፣ ሊጠነከሩ ከሚፈለጉት ቁርጥራጮች መጠን 60 አጥፍ የሚበልጥ ውህድ ማዘጋጀት ይመከራል። በተግባር ግን፣ ለትናንሽ አርትሮፖዶች (micro-arthropods)፣ ለተወሰኑ የናሙና መጠን ቢያንስ ከ 4 እስከ 5 አጥፍ የሚበልጥ የአልኮል መጠን ይጨምራል። አልኮሉ በአርትሮፖዶ ህብረ ህዋስ ውስጥ ያለውን ውሃ ሁሉ በሚያስወግድበት ጊዜ ጥንካሬው (strength) እየቀነሰ እንደሚሄድ መዘንጋት የለብዎትም።

ሲጠቃላል፡-

- ኤቲል አልኮል ቀላሽ ኬሚካል (reducing chemical agent) ስለሆነ ከአክሳይድ አድራጊ ማቆያ ውህዶች ጋር ተኩሃኝ አይደለም።
- ፕሮቲኖችን በከፍተኛ ሁኔታ ያዘቅጣል (precipitates) እና ባህሪያቸውን ይለውጣል (denatures)፤
- የተወሰኑ ውስብስብ ቅጣቶችን (complex lipids) ያሟሟል እንዲሁም ግላይኮጅንን (glycogen) ያዘቅጣል፤

- በህብረህዋሳት ላይ ከፍተኛ መኮማተርን ያስከትላል እንዲሁም ያጠነክራቸዋል።

ቤዛማ የፖታሲየም ወይም የሶዲየም ሃይድሮክሳይድ ውህዶች (Basic potassium or sodium hydroxide solutions)

በኢንቶሞሎጂ (የነፍሳት ጥናት) ውስጥ የእነዚህ ውህዶች አጠቃቀም ያለበቁ ምክንያት በጥንኝነት በፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ ላይ ያተኩራል።

- **ሶዲየም ሃይድሮክሳይድ [E524] (Sodium hydroxide):** በወህድ መልክ በተለያዩ ምጥነት ወይም የንጥረ ነገር ምጥነት ልኬት (normality) ይገኛል። በከኒኖች (pellets) ወይም በደቃቅ ዱቄት (glitter) መልክ ይመጣል። ዋናው ጉዳቱ ከፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) በበለጠ ሁኔታ ውሃን የሚስብ (hygroscopic) መሆኑ ነው። ከፕሮቲኖች ጋር በሚገናኝበት ጊዜ ያሟሟቸዋል፤ ከቅጣቶች (lipids) ጋር ደግሞ በሳፕሬኪኬሽን (saponification - የሳሙና ዝግጅት ሂደት) ወቅት ወደ ጠንካራ ሳሙና ይለውጣቸዋል። ይህም በሳፕሬኪኬሽን (Saponification) ወቅት ፈሳሽ ሳሙና ከሚሰጠው ፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) ጋር ያለው ዋናው ልዩነት ነው።

- **ፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ [E525] (Potassium hydroxide):** በሙሉ ምጥነት (concentrated) ሊገኝ የሚችል ውህድ ነው። ነገር ግን በ0.1 ግራም ገደማ በሚመዘኑ ከኒኖች (pellets) ስለሚገኝ ትክክለኛ ሚዛን በሌለበት ሁኔታ የቀጠነ ምጥነት ያላቸው ውህዶችን ለማዘጋጀት ሂደቱን በጣም ያመቻቻል። ለምሳሌ 1 ኪጊን (0.1 ግራም) በ 1 ሚሊ ሊትር የተጣራ ውሃ ውስጥ 10% ውህድ ይሰጣል። የፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ ከኒኖች ሁለተኛው ጥቅማቸው ለካርቦኔሽን (carbonation) ያላቸው ዝቅተኛ ተጋላጭነት ነው። የፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) ውህድ ከአየር ላይ ካርቦን ዳይኦክሳይድን (CO₂) የመሳብ ከፍተኛ አቅም አለው። ይህም የካርቦኔት ጨው ይፈጥራል።

- እነዚህ ጠንካራ ቤዛች (strong bases) የሰባ አሲዶችን (fatty acids) በውሃ ወደ ሚሚሚ ሳሙናነት ለመቀየር ያገለግላሉ። አንድ ኢታኖል ያሉ ማቆያ ውህዶች በናሙናው ውስጥ ያሉ አንዳንድ ቅጣቶችን አስቀድመው እንደሚያሟሟቸው መታወስ አለበት። ሆኖም ናሙናውን በውሃማ ውህድ ውስጥ ባለው ጠንካራ ቤዛ በመተካት፣ የሰባ አሲዶች (በጥቂት ወይም በበዛ ሁኔታ ውስብስብ የሆኑ) እንዲዘቅጡ (precipitate) ያደርጋል። ስለዚህ ጠንካራ ቤዛ ቀዝቃዛ ሳፕሬኪኬሽን (cold saponification) ያከናውናል። በአንዳንድ ሁኔታዎች፣ ለምሳሌ በሴት ነፍሳት ውስጥ የሰባ ህብረህዋሳት (adipose tissues) በብዛት በሚገኙበት ጊዜ፣ አፀግብሮትን ለማቀጠፍ የሙቀት መጠኑን ከ35-40ድግሪ ሴንቲ ግራድ ከፍ ማድረግ ወይም በከፍል መቀት ውስጥ የሚቆይበትን ጊዜ ማራዘም ጠቃሚ ይሆናል።

ባለቀለም አሲዳማ ውህድ / ቀለም የሌለው የማርክ-አንድሬ (Marc-André) ውህድ፡-

እዚህ ጋር የማርክ-አንድሬ ውህድን ጠቀሜታ እና የአጠቃቀም ጉድለቶችን እንመረምራለን። ይህ ውህድ ከክሎራል ሃይድሬት (Chloral hydrate = trichloroacetaldehyde monohydrate)፣ ከአሲቲክ አሲድ እና ከውሃ የተሰራ ነው። ውህዱ ከፍተኛ የማከሲድ (oxidizing) ባህሪ አለው (የአሲድ እና አልዲሃይድ ድብልቅ)። በናሙናዎቹ ውስጥ ሊቀር የሚችለውን ትርፍ ፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) ያረክሳል፤ ይህንንም የሚያደርገው በ KOH አጠቃቀም ወቅት የተፈጠሩትን አልካላይን ሳሙናዎች ሳያዘቅጥ (without precipitating) ነው። ይህ አክሳይድ አድራጊ ውህድ (oxidizing solution) በቺቲን ውስጥ በሚፈጠሩት ግላሱሳሚኖች (glucosamines) የሁለተኛ ደረጃ አልኮል ተግባራት (secondary alcohol functions) ላይም ተጽዕኖ ይኖረዋል። ይህም የሚሆነው ውህድ ግላሱሳሚኖችን አክሳይድ በማድረግ ቺቲኑ እንዲሰሰልስ (softening) ያደርጋል። ሌላው ተግባሩ ደግሞ በውስጡ የሚገኙ የተወሰኑ ማዕድናት ጨው (mineral salts) እንዲሟሟ ማድረግ ነው።

አስቀድሞ በአሲድ ፉክሲን (acid fuchsine) የቀለመ የማርክ-አንድሬ ውህድ (በአክሳይድ ሁኔታ ላይ እያለ)፣ በመጥቀሩ ሁለተኛ ደረጃ ላይ የሚገኙ አካላት

መጣበቅ ይችላል። በማርክ-አንድሬ ወይም ውስጥ ከቆየ በኋላ እና ናሙናዎቹ የመቅለም ደረጃ ላይ ከደረሱ በኋላ፣ የማለቅለቅ ሂደቱ በኢታሮል ብቻ ይከናወናል። በዚህም የናሙናዎቹን ውሃ የማስወገድ (dehydration) ደረጃ እንጀምራለን።

ጥቅሞች፡-

- ከመጠን በላይ የሆኑ ቤዛማ (basic) ወይዶችን ያረክሳል።
- ችቲንን (Chitin) ማላላት (Relaxation)።
- የችቲን (Chitin) ውስጣዊ መዋቅሮችን በተሻለ ሁኔታ ለመገምገም ችቲንን (Chitin) ማቅለም።

ጉድለቶች፡- ከሎራል ሃይድሬት ሰዎችን የማደንዘዝ (hypnotic) ባህሪ ያለውና በሰው ሕክምና ውስጥ ጥቅም ላይ የዋለ ነው። በኬሚካል መሳሪያ (chemical hood) ውስጥ ጥቅም ላይ መዋል አለበት፣ እንዲሁም የኬሚካል አደጋ ሕጎች መከበር አለባቸው።

ውሃን የማስወገጃ ወይዶች (Dehydration solutions)፡-

ልምድ እንደሚታየው በጣም ትናንሽ ከሆኑ ናሙናዎች ወይን ለማስወገድ መጠናቸው እየጨመረ የሚሄድ የአልኮል መታጠቢያዎችን ቅደም ተከተል መከተል አስፈላጊ አይደለም። ናሙናው ትልቅ ከሆነ ግን በ80% ኢታሮል እንጀምራለን፣ በመቀጠልም በ 90%፣ በ 95% እና በመጨረሻም በ100% ኢታሮል (absolute) ይዘራል። በጣም ትናንሽ ናሙናዎች ሲሆኑ፣ በ 90% ኢታሮል መታጠቢያ እና በመቀጠልም በንጹህ ኢታሮል ውስጥ ማዘፈቅ ይቻላል። በዚህ ደረጃ ላይ፣ ንጹህ ኢታሮል በአየር ውስጥ ያለውን እርጥበት ለመሳብ እንደሚሞከር ሁልጊዜ ማስታወስ ይገባል።

በኢንቶሞሎጂ ቤተ-መከራዎች ውስጥ የነበረው ልማድ የናሙናዎቹን ውሃ የማስወገድ ሂደት በቢች ክሪኦሶት (beech creosote) መታጠቢያ ማጠናቀቅ ነበር። ዛሬ ግን ይህ ንጥረ ነገር አንድ ፀረ-ተባይ፣ ፀረ-ፈንገስ እና የአንጨት ማቆያነት በስፋት የሚያገለግል ቢሆንም፣ ስሪቱ ፖሊሳይክሊክ አርማቲክ ሀይድሮ ካርቦን (polycyclic aromatic hydrocarbons) የያዘ በመሆኑ ባለው ጠረን ምክንያት እና የመራቢያ አካልን የሚጎዳ (reprotoxic)፣ ካንሰር አምጪ፣ ቀጣይነት ያለው የኦርጋኒክ ብክለት (Persistent Organic Pollutant) እና በውሃ ውስጥ ባሉ ሕይወት ላላቸው ነገሮች ጎጂ እንደሆነ ስለሚታሰብ በጥብቅ እንዳይሠራበት ይመከራል።

ናሙናዎችን ለማንበር የሚመከረው ወይዶ የፓራል (Euparal®) እና የዩፓራል ኢሴንስ (Euparal essence) ነው (በሚቀጥለው አንቀጽ ተብራርቷል)። የዩፓራል እና የዩፓራል ኢሴንስ ድብልቅ በጣም ተቀባይነት ያለው ነው፣ ናሙናዎቹም ከ 90% የአልኮል መታጠቢያ በኋላ የሚገኙ ናቸው።

አባሪ 2፡- ጥቅም ላይ የሚውሉ ሪአጀንቶች ስብጥር (Appendix 2: Composition of the reagents used)

10% ፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (Potassium hydroxide 10%)፡-

- ፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (Potassium hydroxide) --- 10 ግራም
- የተጣራ ውሃ (Distilled water) --- በቂ መጠን እስከ 100 ሚሊ ሊትር (mL)

የጋም ከሎራል ማንበሪያ ወይዶ - የሆየር (Hoyer) ወይዶ (Gum chloral mounting medium Hoyer medium)፡-

- የተጣራ ወይዶ (Distilled water) --- 50 ሚሊ ሊትር (mL)
- ከሎራል ሃይድሬት (Chloral hydrate) --- 200 ግራም
- ገም አረቢክ (Gum arabic) --- 50 ግራም
- ግሊሰሮል (Glycerol) --- 20 ሚሊ ሊትር (mL)

የማርክ-አንድሬ ወይዶ (Marc-André solution)፡-

- ከሎራል ሃይድሬት (Chloral hydrate) --- 40 ግራም
- ግላሻል አሲቲክ አሲድ (Glacial acetic acid) --- 30 ሚሊ ሊትር (mL)
- የተጣራ ውሃ (Distilled water) --- 30 ሚሊ ሊትር (mL)

1% አሲድ ፉክሲን በተጣራ ውሃ (Fuchsin acid 1% in distilled water)፡-

- አሲድ ፉክሲን ዱቄት (Acid fuchsin powder) --- 1 ግራም
- የተጣራ ውሃ (Distilled water) --- 99 ሚሊ ሊትር (mL)

በፉክሲን የቀለመ የማርክ-አንድሬ ወይዶ (Marc-André solution colored with fuchsin)፡-

- የማርክ-አንድሬ ወይዶ (Marc-André solution) --- 10 ሚሊ ሊትር (mL)
- 1% ፉክሲን (Fuchsin 1%) --- 50 ማይክሮ ሊትር (µL)

አባሪ 3፡- ዩፓራል (Euparal®)፣ ካናዳ ባልሳም፣ ፖሊቪኒል አልኮል ወይም ሌሎች የማንበሪያ ወይዶች (Appendix 3: Euparal®, Canada balsam, polyvinyl alcohol or other solutions for mounting)

ፖሊቪኒል አልኮል (Polyvinyl alcohol)፡- ትክክለኛ የውሃ ማስወገድ (dehydration) ሂደት ለማከናወን የሚያስፈልጉ ግብዓቶች በማይኖሩበት ጊዜ ይህ ተመራጭ የማንበሪያ ወይዶ ነው። ፖሊቪኒል አልኮል ከአማን ላክቶሬናል (Amman's lactophenol) ጋር ይደባላል። ሆኖም፣ እነዚህ ስብስቦች ውሃው በመትነጥ ምክንያት የመድረቅ ወይም ፖሊቪኒል አልኮል ጥርኝ የመፍጠር ባህሪ ያሳያል (crystallizes)። በተጨማሪም ፊኖሎ አክሳይድ በሚሆንበት ጊዜ የመጥቆር ከፍተኛ ድክመቶች ይታያሉባቸዋል። ይህ ዘዴ ለጥቂት ጊዜ ለሚቆይ (short-term) ማንበሪያ ጥሩ ዘዴ ነው።

ካናዳ ባልሳም (Canada Balsam)፡- በስላይድ እና በሽፋን መስተዋጥ መካከል ናሙናን ለማንበር ጥቅም ላይ ሲውል፣ ናሙናዎች ውሃቸው መወገድ (dehydration) አለበት። የዛይሊን (xylene) ወይም የቶሎዊን (toluene) አጠቃቀም የራሱ የሆኑ አስቸጋሪ ሁኔታዎች አሉት።

ኤነሴ ወይዶ (Enecé medium)፡- እንደ ካናዳ ባልሳም ሁሉ በስላይድ እና በሽፋን መስተዋጥ መካከል ናሙናን ለማንበር የናሙናውን ውሃ ማስወገድ ይጠይቃል። የኤነሴ ወይዶ (Enecé formulation)፡- ንጹህ ነጭ ኮሎሮኒ (22 ግራም)፣ በአልኮል የሚሟሟ ኮፓል ገም (12 ግራም)፣ ንጹህ አልኮል (20 ሚሊ ሊትር)፣ ካምፎር (10 ግራም)፣ የተርፔንታይን ኢሴንስ (10 ሚሊ ሊትር)፣ እና የካሊፕቶል (26 ሚሊ ሊትር)። ዝግጅቱ፡- እንደ ኤርሊንግሮ ፍላስክ ባለ ዕቃ ውስጥ ንጹህ አልኮል እና ካምፎሩን መጨመር፣ በመቀጠል ኮሎሮኒ እና ኮፓል ገምን መጨመር። ፍላስኩን በከዳን ዘግተው ካስከረከሩ በኋላ፣ ድብልቁ እንዳይፈላ በዝቅተኛ ሙቀት በቤን-ማሪ (bain-marie - የውሃ ትነት ሙቀት) ማሞቅ። ይዘቱ ሙሉ በሙሉ ወደ ፈሳሽነት ሲቀየር፣ የተርፔንታይን ኢሴንስ ይጨመራል፣ ከዚያም ድብልቁ ገና ትኩስ እያለ ይጣራል (filtered)፣ በመጨረሻም የካሊፕቶል በተጣራው ፈሳሽ ላይ ይጨመራል። ወይን ፈሳሽነቱ ሲቀንስ፣ በሚከተለው ቀመር በተዘጋጀ ኤነሴ ማቅጠን፡- ንጹህ አልኮል (30 ሚሊ ሊትር)፣ ካምፎር (17 ግራም)፣ የተርፔንታይን ኢሴንስ (15 ሚሊ ሊትር)፣ የካሊፕቶል (38 ሚሊ ሊትር) (Cerqueira, 1943)።

ዩፓራል (Euparal®)፡- ይህ ከአትላስ ጥድ (Tetraclis articulata) የሚገኝ ሙጫ (resin) ሲሆን በ 1906 በጊልሰን (Gilson) ጥናት ተደርጎበት የለም ነው። ዋናው ጥቅም ወደ ፖሊመርነት አለመቀየሩ (does not polymerize) ነው። በስላይድ እና በሽፋን መስተዋጥ መካከል የተነበሩ ናሙናዎችን በአልኮል ወይም ይበልጥ በተሻለ ሁኔታ በዩፓራል ኢሴንስ (Euparal® essence) አማካኝነት በቀላሉ መልሶ ማውጣት ይቻላል። ሳንዳራክ (sandarac) ተብሎም የሚጠራው ይህ ሙጫ፣ ከ 80% ጀምሮ ያለውን ኢታሮል ይቀበላል።

ትራቶን X100 (Triton X100) አጠቃቀም፡- አዮኒክ ያልሆነ ወይም ወይዶ (non-ionic aqueous solution)፡-

ትራፊን X100 አዮኒክ ያልሆነ ወሃማ ወህድ (4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol solution, or t-octylphenoxypolyethoxyethanol, polyethylene glycol tert-octylphenyl ether) ሲሆን፣ በሌሎች እና ሞለኩላር ባዮሎጂ ውስጥ እንደ ማጽጃ (detergent) በስፋት ያገለግላል። ይህ የማጽጃ ወህድ በሴል እና በኒውክሊየስ ሽፋን (membranes) አሳላፊ ቀዳዳዎችን (permeabilization) ይፈጥራል።

የነፍሳት ናሙናዎች ለብዙ ዓመታት በአልኮል ውስጥ ማቆየት የተለመደ ተግባር ነው። እንደ አለመታደል ሆኖ፣ በአልኮል ውስጥ ማቆየት እንከን አልባ አይደለም፣ ስለሆነም በዚህ ሁኔታ የቆየ አርትሮፖድ ናሙናዎችን ለማይክሮስኮፕ ምርመራ ማዘጋጀት በጣም አስቸጋሪ ይሆናል። ናሙና የያዙት ፕላስቲኮች ብዙ ጊዜ ይበላሻሉ፣ ይህም አልኮል እንዲተን ያደርጋል። በሁለቱም ሁኔታዎች፣ ከአልኮል ጋር ለረጅም ጊዜ መገናኘት ወይም የናሙናዎቹ መድረቅ አውነተኛ ችግር ይፈጥራል። በ 2008፣ ጆንክ (Jonque) የተባለ ባለሙያ አንደኛው የፎቶሚክስ ፊልሞች ለማርጠብ የሚያገለግለው አጌፖን (Agepon) የተባለ አርጣቢ ወህድ (wetting agent) ሽራራቸውን መልሶ ለማለስሰስ (rehydration) እንደሚጠቅም አንድ ማስታወሻ አሳትሞ ነበር [26]። ይህ ጠንካራ ማጽጃ (detergent) ያልሆኑ አርጣቢ ወህዶችን የመጠቀም ሐሳብን አመነ።

ከዚህ በታች በ 0.5% የውሃ ወህድ ውስጥ ትራፊን X100 (Triton X100) የመጠቀም ሂደት ቀርቧል፡-

- የደረቀውን ናሙና በንጹህ አልኮል (absolute alcohol) ማርጠብ።
- ናሙናው ሙሉ በሙሉ እንዲሰምጥ የሚያስፈልገውን ያህል መጠን ያለው 0.5% የትራፊን X100 ወህድ መጨመር።
- ለ 5 ደቂቃ ወይም ከዚያ በላይ ይተው። ሁሉም የአርትሮፖዶች ናሙናዎች በወህዱ ውስጥ ብቻ ለብቻ መሆን አለባቸው።
- የትራፊን X100 ወህዱ ይወገድና በፖታሲየም ሃይድሮክሳይድ (KOH) ወህድ ይተካል።
- በመቀጠል ከላይ የተገለጸው አሰራር ይቀጥላል።

አባሪ 4፡- ዩፓራል (Euparal®) ወይም ካናዳ ባልሳም (Canada Balsam) በመጠቀም ደረጃ በደረጃ ናሙናን የማንበር ዘዴ

1. ናሙናዎች ወሃቸው በሚገባ መወገድ (dehydrated) አለበት (የደመናማ ወይም የወተት መልክ መታየት ውሃው በሚገባ አለመወገድን ያሳያል)።
2. ውሃን የማስወገድ ሂደት የኤቲል አልኮል ምጥነትን ደረጃ በደረጃ በመጨመር ሊከናወን ይችላል።
3. ናሙናዎች ከ 99% አልኮል ወይም ከ100% አልኮል (Alcohol) ወደ ማጥሪያ ወህድ (clearing agent) ሊዘወሩ ይችላሉ።
- 4.

የሥራ ቅደም ተከተል (Procedure)፡-

1. የአሸዋ ዝንብዎችን በ70% ኤታናል (Ethanol) ውስጥ ያስቀምጡ(put)።
2. ኤታናልን (Ethanol) በማስወገድ በ 10% ፖታሲየም ሃይድሮ ኦክሳይድ (KOH) መተካት። የአሸዋ ትንኞቹን በመስታወት ስላይድ መሸፈን።
3. ነፍሳቱ ብርሃን አሳላፊ (transparent) እስኪሆኑ ድረስ ማለስሰስ (Macerate)።
4. ፖታሲየም ሃይድሮ ኦክሳይድን (KOH) ማስወገድ።
5. ናሙናውን በተጣራ ውሃ ሸፍኖ ከ 30 እስከ 45 ደቂቃ ማቆየት።
6. ውሃውን ማስወገድና በድጋሚ በተጣራ ውሃ ለ 30 ደቂቃ መዘፍዘፍ (ጊዜው እንደ ናሙናዎቹ ብዛት ይወሰናል)። ብዙ ናሙናዎች በአንድ ላይ

ሲሰሩ ረጅም ጊዜ ያስፈልጋል፤ ጥቂት ሲሆኑ ወይም በተናጠል ሲሰሩ ጊዜው ሊያጥር ይችላል።

7. ውሃውን ማስወገድ።
8. የማርክ-አንድሬ (Marc-André) ወህድ (ከተቻለ በአሲድ ፉክሲን የቀለመ) መጨመርና ለ 24 ሰዓት (አንድ ቀን) ማቆየት።
9. የማርክ-አንድሬ (Marc-André) ወህዱን ማስወገድ።
10. ናሙናውን በተጣራ ውሃ ሸፍኖ ከ 30 እስከ 45 ደቂቃ ማቆየት።
11. ውሃውን በማስወገድ በድጋሚ በተጣራ ውሃ ወስጥ ለ 30 ደቂቃ መዘፍዘፍ።
12. ውሃውን ማስወገድ።
13. 70% ኢታናል (Ethanol) በመጨመር ናሙናውን መበለት፡-
 - ለጭንቅላት እና ለሆድ (abdomen)፡- ጭንቅላቱን ወይም ሆዱን ከደረት (thorax) ላይ ቀስ ብለው መሳብ።
 - ለደረት (thorax) ክፍል፡- ደረቱን በአንድ የእጅ መቆንጠጫ (forceps) በመያዝ እና የከንፎቹን መሠረት በሌላ የእጅ መቆንጠጫ በመሳብ ከከንፎቹ ያስወግዱ። እንደ ፍላጎትዎ እና ይበልጥ ማየት እንደሚፈልጉት የአካል ክፍል ላይ በመመስረት፣ ደረቱን ወደ ግራ እና ቀኝ ወገን በመክፈል የጎንዮሽ መበለት (sagittal dissection) ይቻላል።
14. ደረጃ በደረጃ ምጥነቱን በሚጨምር የኤቲል አልኮል (Ethyl alcohol) ወህዶች (50% – 80% – 95% እና በመጨረሻም 100% አልኮል[alcohol]) ውሃውን ማስወገድ።
15. ናሙናዎቹን በ 100% ኢታናል (Ethanol) ሁለት ጊዜ፣ ለአያንዳንዱ 10 ደቂቃ በማጠብ ውሃውን ሙሉ በሙሉ ማስወገድ።
16. ኢታናልን (Ethanol) በማስወገድና ናሙናዎቹን በቅርንፉድ ዘይት (clove oil) በመሸፈን ለ 15 ደቂቃ በክፍል መቀት ማቆየት።
17. ናሙናዎቹን ከቅርንፉድ ዘይት ወስጥ በማውጣት በንጹህ ስላይድ ላይ ወዳለ የዩፓራል (Euparal®) ወይም የካናዳ ባልሳም (Canada balsam) ጠብታ ማዛወር።
18. ናሙናን እንደሚከተለው ማደራጀት፡- የአሸዋ ትንኝ ጭንቅላት፣ ደረት (thorax) እና ሆድ ዕቃ (abdomen) በደቃቅ መርፌዎች ወይም በመቆንጠጫ (forceps) በመታገዝ በአጎሊ መነጻር (dissecting microscope) ስር ተለይተው ሊበለቱ ይችላሉ። ጭንቅላቱ በሆድ-ጀርባ አቅጣጫ (ventro-dorsal position) እንዲቀመጥ ከአካሉ መለየት አለበት፣ ይህም ማለት የሳይባሪየም (cibarium) ክፍል በቀጥታ እንዲታይ የጭንቅላቱ የኋላ ቀዳዳ (occipital foramen) ወደ ላይ መዘር አለበት። የመበለት ሥራው የሚከናወነው በማንበሪያ ወህድ (mounting medium) ውስጥ ነው።
19. ናሙናው ተጣባቂ (sticky) እስኪሆን ድረስ ማቆየት።
20. ንጹህ የሽፋን መስተዋት (coverslip) በ100% አልኮል ማርጠብ እና የሽፋን መስተዋት በካናዳ ባልሳም (Canada balsam) ላይ ጋደል አድርጎ መጫን።
21. በመጨረሻም ስላይዶቹን በደረቅ ሳጥን ውስጥ ማስቀመጥ።