


# ទម្រង់ការណ៍ណែនាំនៃដំណើរការវិភាគ និង mounting phlebotomine sand flies

Translated by Kimsear Nov, Sovanncheypo Chao & Didot Prasetyo

Fano José Randrianambinintsoa<sup>1</sup>, Laure Augendre<sup>1</sup>, Jorian Prudhomme<sup>1</sup>, Jean-Philippe Martinet<sup>1</sup>, Mathieu Loyer<sup>1</sup>, Nalia Mekarnia<sup>1</sup>, Hocine Kerkoub<sup>1</sup>, Farzana Khan Perveen<sup>1</sup>, Antoine Huguenin<sup>1,2</sup>, Emilie Kariya<sup>1,2</sup>, Mohammad Akhoundi<sup>3</sup>, Andrey José de Andrade<sup>4</sup>, Eduardo Berriatua<sup>5</sup>, Gioia Bongiorno<sup>6</sup>, Sébastien Boyer<sup>7,8</sup>, Vasiliki Christodoulou<sup>9</sup>, Magda Clara Vieira Da Costa-Ribeiro<sup>10</sup>, Lucas Alexandre Farias de Souza<sup>10</sup>, Huicong Ding<sup>11</sup>, Blaise Dondji<sup>12</sup>, Vít Dvořák<sup>13</sup>, Ozge Erisoz Kasap<sup>14</sup>, Eunice Aparecida Bianchi Galati<sup>15</sup>, Montserrat Gállego<sup>16</sup>, Cristina Ballart<sup>16</sup>, Stavroula Gouzouli<sup>17</sup>, Nabil Haddad<sup>18</sup>, Rezki Sabrina Masse<sup>19</sup>, Asrat Hailu Mekuria<sup>20</sup>, Vladimir Ivovic<sup>21</sup>, Szymon Kaczmarek<sup>22</sup>, Mohd Khadri Shahar<sup>19</sup>, Oscar D. Kirstein<sup>23</sup>, Edwin Kniha<sup>24</sup>, Iva Kolářová<sup>13</sup>, Lincoln Timinao<sup>25</sup>, Cristian Lucanas<sup>26</sup>, Ognyan Mikov<sup>27</sup>, Kimsear Nov<sup>7</sup>, Yusuf Özbel<sup>28</sup>, Bernard Pesson<sup>29</sup>, Laura Cristina Posada Lopez<sup>30</sup>, Didot Budi Prasetyo<sup>1,7</sup>, Nil Rahola<sup>31</sup>, Eduardo A. Rebollar-Tellez<sup>32</sup>, Bruno Leite Rodrigues<sup>15</sup>, Lalita Roy<sup>33</sup>, Prasanta Saini<sup>34</sup>, Chizu Sanjoba<sup>35</sup>, Paloma Helena Fernandes Shimabukuro<sup>36</sup>, Padet Siriyasatien<sup>37</sup>, Agnieszka Soszyńska<sup>22</sup>, Tatiana Suleşco<sup>38</sup>, Massamba Sylla<sup>39</sup>, Majhalia Torno<sup>40</sup>, Petr Volf<sup>13</sup>, Khamsing Vongphayloth<sup>41</sup>, Vu Sinh Nam<sup>42</sup>, April Wardhana<sup>43</sup>, Eric Yessinou<sup>44</sup>, Sonia Zapata<sup>45</sup>, Jean-Charles Gantier<sup>1</sup>, and Jérôme Depaquit<sup>1,2,\*</sup> 

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

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

<sup>3</sup> 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

<sup>4</sup> Parasitology Collection of Basic Pathology, Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba 19031, Brazil

<sup>5</sup> Department of Animal Health, University of Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo, Murcia, Spain

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

<sup>7</sup> Medical and Veterinary Entomology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh 12201, Cambodia

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

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

<sup>10</sup> 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

<sup>11</sup> Department of Biological Sciences, National University of Singapore, 117558, Singapore

<sup>12</sup> 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

<sup>13</sup> Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, 12800 Prague, Czechia

<sup>14</sup> VERG Laboratories, Department of Biology, Faculty of Science, Hacettepe University, Beytepe, Ankara 06800, Türkiye

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

<sup>16</sup> 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

<sup>17</sup> 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

<sup>18</sup> Faculty of Health Sciences, American University of Beirut, 1107 2020 Beirut, Lebanon

Edited by Jean-Lou Justine

\*Corresponding author: [jerome.depaquit@univ-reims.fr](mailto:jerome.depaquit@univ-reims.fr)

<sup>19</sup> 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

<sup>20</sup> School of Medicine, Addis Ababa University, 28017 - 1000 Addis Ababa, Ethiopia

<sup>21</sup> Faculty of Mathematics, Natural Sciences and Information Technologies, University of Primorska, 6000 Koper, Slovenia

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

<sup>23</sup> Laboratory of Entomology, Ministry of Health, 9134302 Jerusalem, Israel

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

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

<sup>26</sup> Museum of Natural History, University of the Philippines Los Baños, 4031 Laguna, Philippines

<sup>27</sup> National Centre of Infectious and Parasitic Diseases, 1504 Sofia, Bulgaria

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

<sup>29</sup> Retired, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

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

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

<sup>32</sup> 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

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

<sup>34</sup> ICMR-Vector Control Research Centre, Puducherry 605006, India

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

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

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

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

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

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

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

<sup>43</sup> 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

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

<sup>45</sup> 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

**មូលន័យសង្ខេប** - អត្ថបទនេះផ្តល់នូវការណែនាំយ៉ាងទូលំទូលាយ សម្រាប់ដំណើរការវិភាគ និង Mounting សំណាក Phlebotomine មានសារៈសំខាន់ចំពោះការកំណត់អត្តសញ្ញាណលើប្រភេទ និងការកំណត់អត្តសញ្ញាណភ្នាក់ងារបង្ករោគ និងការញែកដោយឡែកនៃភ្នាក់ងារបង្ករោគ។

ទាំងនេះនឹងលើកមកពិភាក្សាអំពីបច្ចេកទេសជាច្រើនដែលសមស្របសម្រាប់ការងារទាំងនៅ field condition និងក្នុងមន្ទីរពិសោធន៍។ ទម្រង់ការណែនាំនេះរួមបញ្ចូលទាំង គោលការណ៍នាំយ៉ាងលម្អិតអំពីការប្រមូលសំណាក ការប្រតិបត្តិ ការទុកដាក់ និងការសម្លាប់តាមសម្រួល (ដោយណែនាំអោយប្រើវិធីបង្កកស្លូត ឬ CO2 ជាជាងប្រើសារធាតុគីមី) នៃ Phlebotomine ព្រមទាំងយុទ្ធសាស្ត្រនៃការរក្សាទុកដូចជាការទុកដាក់នៅក្នុងសីតុណ្ហភាពត្រជាក់ និងការរក្សាទុកក្នុងអេតាណូល។

នៅក្នុងទម្រង់ការណែនាំនេះ យើងនឹងលើកយក កត្តាដែលចាំបាច់សម្រាប់ការសង្កេតដោយមីក្រូទស្សន៍ រួមមាន គុណភាពនៃការរៀបចំ រចនាសម្ព័ន្ធកាយវិភាគសាស្ត្រមួយចំនួន (សរីរាង្គបន្តពូជ, ក្បាល និងស្លាប)។ អត្ថបទនេះក៏បង្ហាញអំពីដំណើរការដល់ម្នីតនៃការវិភាគសំណាក រួមទាំងដំណើរការសម្អាតជាមួយសារធាតុផ្សេងៗ ដូចជា ប៉ូតាស្យូមអ៊ីដ្រូស៊ីតបន្ទាប់មកសូលុយស្យុង Marc-André។ ដំណើរការវិភាគនៃការធ្វើ Mounting

នឹងលើកយកមកផងដែរដោយប្រៀបធៀបរវាងសមាសធាតុផ្ទាល់ផ្សេងៗគ្នាដោយសង្កត់ធ្ងន់លើលក្ខណៈសម្បត្តិកែច្នៃ  
 របស់វា និងប្រសិទ្ធភាពនៃការរក្សាទុករបស់វា។ សារធាតុរាវ Hoyer Fluid (ឬហៅថាជា Chloral Gum)  
 ត្រូវបានណែនាំសម្រាប់ការពិនិត្យរូបសាស្ត្រ ជាពិសេសសម្រាប់ការពិនិត្យលើថង់ផ្គុំកម្រិតកាមញី (Spermathecae)  
 ដោយសារតែភាពច្របូកច្របល់របស់វាទោះបីជាវាមិនសមស្របសម្រាប់ការផ្ទុករយៈពេលវែងក៏ដោយ។  
 សមាសធាតុផ្ទាល់ផ្សេងទៀតដែលត្រូវបានលើកមកពិភាក្សាមាន Polyvinyl Alcohol, Euparal®  
 (ដើម្បីកំណត់កម្រិតជាតិទឹកអោយនៅតិចតួច), និង Canada Balsam (ផ្ទាល់ដែលរលាយក្នុងអ៊ីដ្រូកាបូន)  
 ដោយពិបាកចុងក្រោយផ្តល់នូវសមត្ថភាពរក្សាទុករយៈពេលវែង។ វិធីសាស្ត្រដោះស្រាយសំណាក DNA  
 Sequencing និង MALDI-ToF  
 ត្រូវបានលើកយកមកពិភាក្សាក្នុងអត្ថបទនេះព្រោះវាផ្តល់នូវជំនួយដល់ការវិភាគសំណាកផងដែរ។  
 លើសពីនេះទៅទៀត វីដេអូបង្ហាញដែលបង្ហាញពីបច្ចេកទេសនៃការរៀបចំកញ្ចក់ឡាម ព្រមទាំងការបកប្រែជា ៣៣  
 ភាសាផ្សេងៗគ្នា ត្រូវបានផ្តល់អនុញ្ញាតឱ្យគោលការណ៍ណែនាំនេះឆ្លើយតបទៅនឹងតម្រូវការ  
 និងការរំពឹងរបស់សហគមន៍វិទ្យាសាស្ត្រសកល។

**ពាក្យគន្លឹះ:** ការកំណត់សំណាកលើកញ្ចក់ឡាម (Mounting), phlebotomine sand fly, សារធាតុរាវ Hoyer, សូលុយស្យុង  
 Marc-André, chloral gum, អាស៊ីត polyvinyl, Euparal®, Canada balsam, ការញែកបំបែក Leishmania,  
 លក្ខណៈនៃកន្លែងបំពេញបេសកកម្ម (Field condition), បណ្តុះ, ការកាត់បំបែក, ជីវមូលេគុល, MALDI-ToF,  
 ប្រភេទសំណាក (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 CO<sub>2</sub> 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.

**សេចក្តីផ្តើម**

Phlebotomine sand flies ជាសត្វល្អិតតូចក្នុងលំដាប់  
 Diptera ល្អិតក្នុងក្រុម Psychodidae អនុក្រុម  
 Phlebotominae ដែលមានយ៉ាងហោចណាស់ 1,063  
 ប្រភេទដែលបានកំណត់អត្តសញ្ញាណរួចហើយ [21]។  
 ពួកវាជាភ្នាក់ងារចម្លងរោគយ៉ាងសំខាន់ទៅតាមលំដាប់  
 ដែលរួមមាន Leishmania, arboviruses និង Bartonella  
 ដែលបណ្តាលឱ្យកើតជំងឺ leishmaniasis, arboviral infections  
 និង bartonellosis ។  
 ជាចម្បងនៃការកំណត់អត្តសញ្ញាណរបស់ Phlebotomine  
 sand flies

ផ្អែកលើការពិនិត្យដោយមីក្រូទស្សន៍យ៉ាងលម្អិតដែលត្រូវ  
 បានអនុវត្តក្រោមលក្ខខណ្ឌប្រមូលសំណាកយ៉ាងប្រុងប្រយ័  
 ត្ន ការរក្សាទុកសមស្រប និងការរៀបចំកញ្ចក់ឡាម  
 ដោយប្រើបច្ចេកទេសជំនាញជាច្រើនជំហាន  
 ដែលដំណាក់កាលនីមួយៗមានចំណុចពិសេស  
 និងដែនកំណត់រាងខ្លួន។

ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ Phlebotomine sand flies  
 ពេញវ័យផ្អែកលើការសង្កេតទាំងរចនាសម្ព័ន្ធខាងក្រៅ) ឧ .  
 អង្គតែន, palpi, ប្រដាប់បន្តិចពូជឈ្មោល)  
 និងរចនាសម្ព័ន្ធខាងក្នុង) ឧ .pharynx, cibarium និង  
 ថង់ផ្គុំកម្រិតកាមញី) ។ ការបំបែកបំណែក) dissection(  
 និងការញែកដាច់ដោយឡែកនៃរចនាសម្ព័ន្ធខាងក្នុងទាំង

នេះអនុញ្ញាតឱ្យមានការពិនិត្យបានច្បាស់លាស់ និងធានាការកំណត់អត្តសញ្ញាណបានត្រឹមត្រូវ។ Phlebotomine sand flies ឱសពីមូស ឬ kissing bugs ដែលវាតម្រូវឱ្យមានការ Mounting រវាងកញ្ចក់ឡាមនិងឡាម៉ែលមុននឹងធ្វើការកំណត់អត្តសញ្ញាណ។ មុនទសវត្សរ៍ 1980 ការសង្កេតមីក្រូទស្សន៍គឺជាវិធីសាស្ត្រតែមួយសម្រាប់កំណត់អត្តសញ្ញាណ Phlebotomine sand flies ហើយរហូតមកដល់សព្វថ្ងៃនៅតែជាវិធីសាស្ត្រដែលត្រូវបានប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយបំផុត។ ការជ្រើសរើសដំណើរការវិភាគ និងវិធីរៀបចំសំណាកនៅពេលនោះមានលក្ខណៈសាមញ្ញ ដោយផ្អែកលើជម្រើសពីរបៀបភេទ៖) 1) ការ Mounting អចិន្ត្រៃយ៍សម្រាប់ការរក្សាទុករយៈពេលវែង និង) 2) ការ Mounting រហ័សសម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណប៉ុន្តែវាមិនធានាការរក្សាទុករយៈពេលវែងឡើយ។ ការ Mounting អចិន្ត្រៃយ៍ ដូចជា ការប្រើ Canada balsam ត្រូវការពេលវេលាច្រើន ព្រោះត្រូវការដំណើរការដកទឹក ពេញលេញចេញពីសំណាកនោះ។ លើសពីនេះ សន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺរបស់ថ្នាំប្រភេទនេះតែងតែមិនងាយសមស្របសម្រាប់ការសង្កេតផ្នែកទឹកកាមញីទេ។ ផ្ទុយទៅវិញ ការ Mounting ក្នុងថ្នាំលាវ (aqueous medium) ដូចជា Hoyer liquid អនុញ្ញាតឱ្យការរៀបចំបានលឿនជាង និងផ្តល់ភាពច្បាស់ល្អលើការពិនិត្យផ្នែកទឹកកាមញី ដែលមានលក្ខណៈសម្បត្តិអុបទិកខ្ពស់ ប៉ុន្តែមិនអាចធានាការរក្សាទុករយៈពេលវែងបានទេ ព្រោះវាមានលក្ខណៈស្រូបទឹកពីបរិយាកាស។ ជម្រើសមួយផ្សេងទៀតគឺការបិទដំរិញតែមកកញ្ចក់ឡាមដោយប្រើថ្នាំបំពាក់ពណ៌ក្រចក បន្ទាប់ពីកញ្ចក់ស្តុកទាំងស្រុង។ ជម្រើសទាំងអស់នេះមានភាពប្រកួតប្រជែង និងនៅតែមានសារៈសំខាន់ដល់សព្វថ្ងៃ ហើយការជ្រើសរើសវិធីសាស្ត្រការ Mounting អាស្រ័យលើគោលបំណងនៃការរៀបចំសំណាក។ ចាប់តាំងពីទសវត្សរ៍ 1980 ការសិក្សាកំណត់អត្តសញ្ញាណ Phlebotomine sand flies បានបញ្ចូលទាំងការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្ររួមជាមួយវិធីសាស្ត្រគីមីជីវៈ។ ការវិភាគតាមបែប cuticular hydrocarbons គឺជាវិធីសាស្ត្រដំបូង ប៉ុន្តែត្រូវបានជំនួសយ៉ាងឆាប់រហ័សដោយបច្ចេកទេសម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រដូចជា random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), DNA amplification និង DNA sequencing តាមវិធីសាស្ត្រ Sanger ក៏ដូចជា next-generation sequencing (NGS)។ បច្ចុប្បន្ន ម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រត្រូវបាននាំទៅរកនូវការវិភាគដោយវិធីសាស្ត្រ proteomics ដូចជា MALDI-ToF។ លើសពីនេះ ការកំណត់អត្តសញ្ញាណប្រភេទតាមរយៈម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ

អាចរួមបញ្ចូលជាមួយការរកឃើញភ្នាក់ងារបង្កជំងឺតាម PCR (ឧ. *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Bartonella* និង *Phlebovirus*) ដោយសារតែភ្នាក់ងារទាំងនេះអាចត្រូវបានរកឃើញទាំងដោយ end-point PCR និង real-time PCR (qPCR) ដែលតម្រូវឱ្យមានការកែប្រែការប្រមូលសំណាក និងរក្សាទុកសំណាកឱ្យសមស្របទៅនឹងគោលបំណងស្រាវជ្រាវ] 3, 32] ។ ក្រៅពីការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រដែលបានលើកឡើងខាងលើត្រូវបានប្រើប្រាស់ជាម្ចាស់សម្រាប់ការកំណត់ប្រភេទវិធីសាស្ត្រការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រផ្សេងទៀតក៏អាចអនុវត្តបានដូចជាការពិនិត្យការតម្រៀបសរសៃនៅលើស្លាប (wing-geometry) ។

ដោយផ្អែកជាចម្បងលើបទពិសោធន៍របស់អ្នកនិពន្ធ និងទិន្នន័យដែលបានមកពីអត្ថបទស្រាវជ្រាវផ្សេងៗ គោលបំណងនៃការសិក្សានេះគឺផ្តល់ទម្រង់ការណែនាំស្តង់ដារសម្រាប់ការ Mounting និងដំណើរការវិភាគសំណាក Phlebotomine sand flies ពេញវ័យដើម្បីបង្កើនប្រសិទ្ធភាពនៃការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ និងជីវម៉ូលេគុល។

ការអនុវត្តវិភាគមួយចំនួន ដូចជាម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ ឬ MALDI-ToF សំណាកអាចជ្រើសយកផ្នែកណាមួយនៃ Phlebotomine sand flies ដែលមិនចាំបាច់ប្រើប្រាស់ក្នុងការកំណត់អត្តសញ្ញាណបែបលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ បង្ហាញពីតម្រូវការជ្រើសរើសវិធីសាស្ត្រក្នុងការអនុវត្តយ៉ាងយកចិត្តទុកដាក់។ ក្នុងអត្ថបទនេះ យើងក៏ផ្តោតលើវិធីសាស្ត្រការសណ្ត់ និង ការសម្លាប់តាមសម្រួលនៃ Phlebotomine sand flies ដែលចាប់បាននៅរស់ ការរក្សាទុក និងដំណើរការ Mounting សម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណរហ័ស ឬសម្រាប់ការរក្សាទុករយៈពេលវែងដែលអនុញ្ញាតឱ្យអនុវត្តការសិក្សាបន្ថែមជាបន្តបន្ទាប់។

**បុព្វកថា៖ ការពិចារណាសុវត្ថិភាព និងបទប្បញ្ញត្តិ (Preamble)**

រាល់ការប្រើប្រាស់សារធាតុគីមីទាំងអស់ដែលបានបញ្ជាក់ក្នុងការណែនាំនេះ ហើយត្រូវអនុវត្តក្រោមលក្ខខណ្ឌសុវត្ថិភាពយ៉ាងតឹងរឹងយោងទៅលើ Safety Data Sheets (SDS) សម្រាប់ព័ត៌មានលម្អិតអំពីហានិភ័យ ការគ្រប់គ្រង និងការចោលសំណល់។ គណៈកម្មាធិការសុខភាព និងសុវត្ថិភាពរបស់មន្ទីរពិសោធន៍អាចផ្តល់ព័ត៌មានអំពីគ្រោះថ្នាក់នៃសារធាតុទាំងនេះ ក៏ដូចជាវិធីសាស្ត្រគ្រប់គ្រង និងបំបាត់សំណល់។ ទោះជាយ៉ាងណាការអនុវត្តតាមសេចក្តីណែនាំសុវត្ថិភាព និងបទប្បញ្ញត្តិជាធរមាន គឺជាកាតព្វកិច្ចចាំបាច់។ អ្នកប្រើប្រាស់ទាំងអស់ត្រូវធានាថា

ការអនុវត្តការងារនៅមន្ទីរពិសោធន៍អនុលោមតាម Good Laboratory Practices (GLP) និងត្រូវនៅក្នុងច្បាប់ជាធរមានរបស់ប្រទេស ឬស្ថាប័ន។ សូមចំណាំថា សារធាតុគីមីខ្លះ ឬសមាសធាតុ .២)Chloral hydrate ត្រូវបានគ្រប់គ្រងតាមច្បាប់នៅប្រទេសខ្លះៗ។ បញ្ជីអក្សរកាត់ដែលប្រើប្រាស់ក្នុងអត្ថបទនេះ ត្រូវបានបង្ហាញក្នុងតារាងទី 1។

តារាងទី 1: បញ្ជីអក្សរកាត់

BME	Basal medium Eagle
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMCP	Camphor-monochlorophenol
CMR	Carcinogenic, mutagenic, reprotoxic substance
COI	Cytochrome c oxidase subunit I gene
CytB	Cytochrome b gene
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
M199	Medium 199
MALDI-ToF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MEM	Minimum essential media
NGS	Next-generation sequencing
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle medium
PCR	Polymerase chain reaction
Lao PDR	Lao People's Democratic Republic
PNOC	Prepronociceptin gene
qPCR	Quantitative PCR (real-time PCR)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RI	Refractive index
RNA	Ribonucleic acid
RNases	Ribonucleases
RNASS	RNA stabilization solution
RT-PCR	Reverse transcription PCR
TFA	Trifluoroacetic acid

### 1. ការចាប់ប្រមូល Phlebotomine sand flies

Phlebotomine sand flies ពេញវ័យត្រូវបានប្រមូលទាំងនៅស្ថានភាពរស់ ឬស្លាប់ដោយអាចប្រើវិធីសាស្ត្រផ្សេងគ្នាដូចជា CDC miniature light traps, អន្ទាក់ក្រដាសស្អិត (sticky traps), ឧបករណ៍បូម (រូមទាំង Shannon traps) ឬការប្រមូលដោយផ្ទាល់ពីមជ្ឈដ្ឋានរស់នៅ Phlebotomine sand flies) ឧ .ទ្រងសត្វ(។ វិធីសាស្ត្រទាំងនេះតឹងផ្អែកលើការដាក់អន្ទាក់នៅក្នុងកន្លែងដែលមាន Phlebotomine sand flies រីឯម្រករបស់វាដោយការទាក់ទាញតាមរយៈពន្លឺ ឬសារធាតុទាក់ទាញផ្សេងៗ) ឧ .CO<sub>2</sub> ឬ chemical lures) និងការប្រមូលសំណាកសម្រាប់វិភាគបន្តដូចបានរៀបរាប់នៅក្នុងអត្ថបទស្រាវជ្រាវជាច្រើន [2, 3, 32, 36, 49]។ ការចាប់ Phlebotomine sand flies ក្នុងស្ថានភាពរស់ដោយអនុវត្តតាមវិធីសាស្ត្រ downstream ជៀសវាងអំឡុងពេលប្រមូលសំណាកធ្វើអោយ Phlebotomine sand flies ស្លាប់បណ្តាលឱ្យប៉ះពាល់ដល់ Leishmania isolation ឬ Virus strains ។ បច្ចេកទេសប្រមូលសំណាកផ្សេងទៀតដូចជាការប្រើក្រដាសស្អិតអាចបណ្តាលឱ្យខូច (បាត់បង់សរីរាង្គ) អង្គតែន, palpi, ស្លាប ឬ ជើង) ជាញឹកញាប់។ ស្រទាប់ប្រេង castor ដែលគេច្រើនប្រើបំពាក់ពណ៌លើក្រដាសស្អិត និងភ្ជាប់ជាមួយរាងកាយ Phlebotomine sand flies ដើម្បីដកយកសំណាកបានគេត្រូវជ្រលក់វាទៅក្នុងល្បាយអេតាណុល និង diethyl ether ក្នុងអត្រាស្មើគ្នា រយៈពេលប្រហែល 15 នាទី នេះគឺជាដំណាក់កាលដំបូងនៃដំណើរការវិភាគសំណាក។

### 2. ការសម្លាប់តាមសម្រួលលើសំណាក

បន្ទាប់ពីការប្រមូល Phlebotomine sand flies ដែលនៅរស់ត្រូវបានសម្លាប់តាមសម្រួល។ ក្នុងវិធីសាស្ត្រប្រមូលមួយចំនួន) ឧ .ក្រដាសស្អិត ឬ CDC light traps ដែលបំពាក់មកជាមួយកំប៉ុងមានផ្ទុកសូលុយស្យុងសាប៊ូឬអេតាណុល) គឺ Phlebotomine sand flies បានស្លាប់រួចហើយអំឡុងពេលប្រមូល។ វិធីសាស្ត្រមួយទៀតគឺវិធីសាស្ត្រត្រូវបានអនុវត្តលើសំណាកដែលប្រមូលដោយផ្ទាល់ក្នុងអេតាណុល ឬលើសំណាកផ្សេងទៀត ឬលើសំណាកផ្សេងទៀត ប្រសិនបើវាក្យាទុកក្នុងអេតាណុលឱ្យបានឆាប់តាមដែលអាចធ្វើទៅបាន។ ទោះជាយ៉ាងណាវិធីសាស្ត្រសម្លាប់ទាំងនេះមិនអនុញ្ញាតឱ្យដំណើរការវិភាគសំណាកដោយ MALDI-ToF ទេ។ លើសពីនេះ វិធីសាស្ត្រផ្សេងទៀតអាចបណ្តាលឱ្យបាត់បង់លក្ខណៈរូបសាស្ត្រដោយផ្នែក។ ដូច្នេះ ការជ្រើសរើសសារធាតុសម្លាប់ស្រដៀងគ្នាដែលសមស្របក្នុងខ្លួនវា ដើម្បីធានាការកំណត់អត្តសញ្ញាណត្រឹមត្រូវ

ប្រការរក្សាទុករយៈពេលវែងជាសំណាកកំរុ ។ សារធាតុគីមីដូចជា ethyl acetate, ethyl ether, tetrachloroethane និង chloroform អោយបញ្ជ្រាបលើសំន្រី ហើយដាក់ក្នុងកំប៉ុងដែលមាន Phlebotomine sand flies ដើម្បីធ្វើការសម្លាប់តាមសម្រួល។ សារធាតុទាំងនេះមានភាពពុល និងត្រូវអនុវត្តតាមសេចក្តីណែនាំរបស់ក្រុមហ៊ុនផលិតយ៉ា ងតឹងរឹង។ យ៉ាងណាមិញ ការមិនផ្តល់អនុសាសន៍ឱ្យប្រើ chloroform ព្រោះបទពិសោធន៍បង្ហាញថាវាមិនសមស្របសម្រាប់ការសិ ក្សាម៉ូលេគុលជីវិវិទ្យាឡើយ ។ ដោយសារភាពគ្រោះថ្នាក់ និងភាពមិនប្រាកដប្រជា នៃភាពសមស្របសម្រាប់វិភាគ លេគុលជីវិវិទ្យាការប្រើសារធាតុគីមីទាំងនេះគួរត្រូវបានកា ត់បន្ថយ។

វិធីសាស្ត្រដែលប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយបំផុត និងអាចរក្សាទុកសរីរវិទ្យា, DNA និងប្រូតេអ៊ីនបានល្អគឺការបង្កកស្ងួត) dry freezing)។ សំណាកត្រូវបានបង្កករយៈពេលមួយគ្រប់គ្រាន់ ដើម្បីធ្វើឱ្យ Phlebotomine sand flies សន្លប់ទាំងស្រុង ប៉ុន្តែមិនគួរយូរលើសដែលវាអាចបណ្តាលឱ្យ i) ស្លូត ឬ ii) ប៉ះពាល់ដល់សមត្ថភាពរបស់ Leishmania ប្រសិនបើមានគោលបំណងញែក Leishmania ពីក្រពះពោះវៀន Phlebotomine sand flies ក្នុងលក្ខណៈ in vitro។ ផ្តល់អនុសាសន៍គួរបង្កករយៈពេល 15–20 នាទី នៅសីតុណ្ហភាព- 20°C ដោយត្រួតពិនិត្យជាប្រចាំ ដើម្បីធានាថាសំណាកនោះបានសន្លប់ទាំងស្រុង ប៉ុន្តែបំណែងស្លូតខ្លះៗមិនត្រូវបានសម្លាប់។ ប្រសិនបើមិនមានទូទឹកកកសីតុណ្ហភាពទាប អាចជ្រើសរើសប្រើ CO<sub>2</sub> សម្រាប់ធ្វើការសម្លាប់តាមសម្រួលបាន។ ក្នុងលក្ខខណ្ឌនៅកន្លែងបំពេញបេសកកម្ម ដែលមិនអាចប្រើផ្ទះ CO<sub>2</sub> ជំនាន់ សំណាកអាចសម្លាប់បានដោយប្រើផ្ទះ CO<sub>2</sub> តូចៗ Soda siphon ប៉ុន្តែវាពិបាកក្នុងការដឹកជញ្ជូនតាមយន្តហោះ។ ជាជម្រើសចុងក្រោយ អាចប្រើផ្សែងថ្នាំជក់ ដោយចាប់ Phlebotomine sand flies រស់ពី CDC trap ដោយប្រើ aspirator រួចរក្សាទុកក្នុងបំពង់ទឹកកែវហើយផ្លូវផ្សែងថ្នាំជក់ចូល ធ្វើបែបនេះអាចសម្លាប់វាបានក្រោយប៉ុន្មានវិនាទី។ វិធីនេះអាចអនុវត្តបានក្នុងគ្រប់ស្ថានភាពនៅ field condition ប៉ុន្តែបំពង់ទឹកកែវអាចជាប់ផ្សែងថ្នាំជក់ពីមុនៗ យើងគួរសម្អាតវាយ៉ាងហ្មត់ចត់មុនប្រើសម្រាប់ប្រមូលសំ ណាករស់។ វិធីសាស្ត្រទាំងនេះអាចអនុវត្តសម្រាប់ធ្វើការញែក Leishmania តាមការបំបែកក្រពះពោះវៀន )ក្រពះពោះវៀន dissection)។

### 3. ការរក្សាទុកសំណាកមុនដំណើរការវិភាគ (Specimen storage before processing)

មានវិធីសាស្ត្រសំខាន់ 5 ប្រភេទសម្រាប់ការរក្សាទុកមុនដំណើរការវិភាគ៖

#### 3.1. ការបង្កក (Freezing)

វិធីសាស្ត្រនេះអនុវត្តបានល្អបំផុតនៅសីតុណ្ហភាព- 20°C ឬល្អជាងនេះនៅ- 80°C។ បច្ចុប្បន្ន វិធីរក្សាទុកដោយទូទឹកកក ត្រូវបានប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយជាងការរក្សាទុកក្នុង អាសូតរាវ។ គ្រប់ករណីទាំងអស់ ការរក្សាទុកដោយការបង្កកជាលក្ខណៈ cryopreservation ត្រូវអនុវត្តឱ្យបានឆាប់តាមដែលអាចធ្វើទៅបាន (បន្ទាប់ពីបានធ្វើឱ្យសំណាកសន្លប់) stunning)។ ការរក្សាទុកក្នុងទូទឹកកកផ្តល់អត្ថប្រយោជន៍ក្នុងការរក្សា ទុកសភាពដើមរបស់សត្វល្អិតទាំងមូល (ព្រមទាំងរក្សាបាននូវសុពលភាព) integrity) នៃ RNA, DNA និងប្រូតេអ៊ីន នៅពេញមួយរយៈពេល។ ផ្ទុយទៅវិញ ការរក្សាទុកក្នុង អាសូតរាវ អាចបង្កការខូចខាតធ្ងន់ធ្ងរដល់ស្លាប ជើង palps និង អង្គតែន ដែលជាញឹកញាប់បណ្តាលឱ្យបែករូបរាងខាងក្រៅ ឬផ្តាច់ចេញ និងអាចបាត់បង់លក្ខណៈនៃការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រសំ ខាន់ៗ។ ការរក្សាទុកដោយការបង្កកស្ងួតក្នុងទូទឹកកកមានភាព ប៉ះពាល់តិចជាង នីត្រូសែនរាវ ប៉ុន្តែមិនមែនជាវិធីល្អបំផុតសម្រាប់ការរក្សាទុកសរីរវិទ្យាដែល មានភាពផុយស្រួយនោះទេ។ ត្រូវចាំថានៅពេលធ្វើការលាយកំណកនៃសំណាក (thawing) ស្លាប អង្គតែន palps ឬជើងអាចភ្ជាប់ជាប់នឹងជញ្ជាំងបំពង់ទឹក ហើយអាចដាច់រំហែកចេញដោយសារការបង្កើតសារធាតុសំ ណើម) condensation)។ ទោះជាយ៉ាងណា ការរក្សាទុកដោយការបង្កក មិនតែងតែអាចអនុវត្តបានក្នុងការសិក្សានៅ field condition ព្រោះត្រូវការទូទឹកកក ឬផ្ទះ អាសូតរាវ។ ការរក្សាទុកក្នុងទូទឹកកកមានភាពសមស្របពេញលេញសម្រាប់ការរកឃើញភ្នាក់ងារបង្កជម្ងឺដោយប្រើឧបករណ៍ជំរុំ លេគុលដោយមិនបាត់បង់ sensitivity។ ទោះបីយ៉ាងណា ការរកឃើញ និងបំបែក RNA viruses តម្រូវឱ្យរក្សាទុកនៅ -80°C ឬក្នុង អាសូតរាវ ប្រសិនបើមានគោលបំណងរក្សាទុករយៈពេលវែង។ ប៉ុន្តែ ការបង្កកសំណាកមិនអាចធ្វើ Leishmania isolation តាមរយៈdissectionក្រពះពោះវៀនទេលុះត្រាតែសំណាក Phlebotomine sand flies បានដកជាមុនក្នុងដំណាក់កាល vapor phase បន្ទាប់មកទើបដាក់ក្នុង អាសូតរាវ (ឧទាហរណ៍ សំណាកដែលដកចេញពីក្នុងស្លូត (

ដើម្បីបង្កើតលក្ខខណ្ឌស្រដៀងនឹងការរក្សាទុក Leishmania ដោយ cryopreservation។

### 3.2. ការរក្សាទុកសំណាកក្នុងអាល់កុល (Ethanol ឬ Isopropyl alcohol)

វិធីសាស្ត្រនេះប្រហែលជាវិធីដែលត្រូវបានប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយបំផុតសម្រាប់ការរក្សាទុក Phlebotomine ។ វាអាចអនុវត្តបានយ៉ាងងាយស្រួលក្នុង field conditions ទោះបីជាស្ថិតក្នុងស្ថានភាពលំបាកដែលគ្មានលទ្ធភាពដូចក្នុងមន្ទីរពិសោធន៍ក៏ដោយ។ ការរក្សាទុកសំណាកក្នុងអាល់កុលមានភាពសមស្របជាពិសេសសម្រាប់ការសិក្សាលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ ព្រោះសរីរាង្គដែលមានភាពផ្សេងៗស្រួយដូចជាស្លាប ជើង អង្កែន ឬ palps អាចរក្សាទុកបានល្អប្រសិនបើមិនមានពុះខ្យល់នៅក្នុងបំពង់ទីបង្កកសំណាក។

ដូច្នេះការផ្តល់អនុសាសន៍ឱ្យបិទបំពង់ទីបង្កកដោយប្រើសំឡឹកប្លាស្ទិកតូចមួយ ដើម្បីបំបាត់ពុះខ្យល់ និងដាក់ស្លាកសញ្ញានៅលើសំឡឹកប្លាស្ទិកនោះ) រូបទី 1) តែកម្រិតភាគរយនៃអាល់កុលនៅតែជាបញ្ហាកំពុងពិភាក្សា។ ជាទូទៅ គេមិនផ្តល់អនុសាសន៍ឱ្យប្រើកម្រិតអាល់កុលក្រោម 70% ទេ [45, 66]។ ការប្រើកម្រិតអាល់កុលខ្ពស់ជាងនេះអាចរក្សាទុក DNA បានប្រសើរជាង និងរយៈពេលយូរជាង ប៉ុន្តែអាចធ្វើឱ្យសំណាកមានភាពផ្សេង និងងាយបែកបាក់ក្នុងការសិក្សាលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ។ ការប្រើអេតាណុលកម្រិត 96% (azeotropic mixture) អាចធានាបាននូវស្ថេរភាពក្នុងរយៈពេលវែង ជាពិសេសនៅតំបន់មានសំណើមខ្ពស់ដូចជាប្រទេសនៅតំបន់ត្រូពិច ទោះបីជាអេតាណុលកម្រិត 95% មានភាពងាយស្រួលក្នុងការរកទិញក៏ដោយ។ ប្រសិនបើមិនក៏ក៏ក៏ DNA ជាទូទៅសំណាកត្រូវបានរក្សាទុកបានល្អក្នុងអេតាណុល (ប៉ុន្តែមានប្រសិទ្ធភាពទាបជាងវិធីបង្កក ជាពិសេសសម្រាប់ការសិក្សាតាមវិធីសាស្ត្រម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រប្រភេទ NGS)។ ផ្ទុយទៅវិញ ប្រូតេអ៊ីនមានស្ថេរភាពទាបជាងយ៉ាងខ្លាំង ជាពិសេសសម្រាប់វិធីសាស្ត្រ proteomics ដូចជា MALDI-ToF ជាដើម។ Phlebotomine sand flies ដែលរក្សាទុកក្នុងអាល់កុលរយៈពេលពីរដប់ខែ នៅតែអាចកំណត់អត្តសញ្ញាណតាមការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្របាន ប៉ុន្តែមិនអាចបង្កើតកម្រិតនៃខ្សែកោងប្រូតេអ៊ីន (reference protein spectra) ពីសំណាកទាំងនេះបានទេ។ ការរក្សាទុកក្នុងអាល់កុល ឬក្នុងស្ថានភាពស្ងួតអាចធ្វើឱ្យប្រសើរឡើង ប្រសិនបើតំឡើងសីតុណ្ហភាពដល់ -20°C។ ការបង្កកនៅ -20°C ជួយបង្កើនការរក្សាទុកសេនេទិច) ឧ .nucleic acids)

ដោយបន្ថយល្បឿនការបំបែក) degradation) ហើយផ្តល់អត្ថប្រយោជន៍បន្ថែមចំពោះការរក្សាទុកលក្ខណៈរូបសាស្ត្រដោយកាត់បន្ថយការបែកបាក់ជាលិកាតាមពេលវេលា យ៉ាងណាក៏ដល់ប៉ុន្តែពេលលើកណ្តុររូបសាស្ត្រមានដែនកម្រិតកំណត់ដាច់ខាតដែលសេនេទិច។ ការរក្សាទុកក្នុងអេតាណុលក៏អាចអនុវត្តសម្រាប់ការរក្សាទុក DNA និង RNA រឺសប្រសិនបើប្រើអេតាណុលក្នុងកម្រិតយ៉ាងហោចណាស់ 70% និងរក្សាទុករយៈពេលខ្លី) មិនលើសពីពីរដប់ខែ។ ក្នុងប្រទេសខ្លះ isopropyl alcohol អាចរកបានងាយស្រួល និងអាចរក្សាទុក DNA បាន ប៉ុន្តែវាធ្វើឱ្យសំណាករឹង។ isopropyl alcohol មិនងាយនេះដូច អេតាណុលទេ ដូច្នេះងាយស្រួលក្នុងការដឹកជញ្ជូន។ បើចាំបាច់ Phlebotomine sand flies ដែលបានរក្សាទុកក្នុងនីត្រូសែនរាវ ឬដោយការបង្កកស្លឹក អាចផ្ទេរទៅក្នុងអាល់កុលបាន ព្រោះវិធីនេះនឹងផ្តល់ទាំងគុណវិបត្តិនៃវិធីទាំងពីរ។



រូបទី 1: Phlebotomine sand flies ដែលរក្សាទុកក្នុង ethanol

### 3.3. ការរក្សាទុកសំណាកក្នុង RNA stabilization solution (RNASS)

ជាសារធាតុរាវដែលត្រូវបានប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយ មិនមានលក្ខណៈពុល និងត្រូវបានរចនាឡើងសម្រាប់បង្កើនស្ថេរភាព និងការពារ RNA ក្នុងសំណាកជាលិកា និងកោសិកាស្រស់។ វាធ្វើសកម្មភាពដោយជ្រៀតចូលក្នុងសំណាកយ៉ាងឆាប់រហ័ស និងបង្កាក់សកម្មភាពអង់ស៊ីម RNases (RNA-degrading enzymes) ដើម្បីបង្ការពីការកម្ទេចទម្រង់ RNA ដោយមិនចាំបាច់ការបង្កកភ្លាមៗ។

ការរក្សាទុកសំណាកក្នុង RNASS  
 ជាទូទៅមានប្រសិទ្ធភាពរក្សាទុករចនាសម្ព័ន្ធជាជីវិត  
 និងកោសិកាទាំងមូល សម្រាប់ការវិភាគប្រវត្តិ  
 ជាជីវិតនោះ។ ទោះបីជា RNASS  
 ត្រូវបានបង្កើតឡើងសម្រាប់ស្ថេរភាព RNA ជាងការធ្វើ  
 fixation ក៏ដោយ  
 ការរក្សាទុករយៈពេលខ្លីទៅថ្ងៃអាចរក្សាបាននូវសុពលភាព  
 ពរចនាសម្ព័ន្ធយ៉ាងល្អ។ RNASS  
 អនុញ្ញាតឱ្យរក្សាទុកសំណាកនៅសីតុណ្ហភាពបន្ទប់រហូតដល់  
 ៧ ថ្ងៃ នៅ 4°C រយៈពេលពីររយប្រាំបួន ឬនៅ -20°C/-80°C  
 សម្រាប់ការរក្សាទុករយៈពេលវែង។  
 វិធីសាស្ត្រនេះមានសារៈសំខាន់ខ្លាំងសម្រាប់ការសិក្សានៅ  
 fi eld condition ឬបរិបទគ្លីនិក  
 ដែលបរិយាកាសក្នុងបន្ទប់មានភាពគ្រោះថ្នាក់គ្រប់គ្រាន់។  
 ជាទូទៅ ការដកស្រង់ RNA តម្រូវឱ្យដកសំណាកចេញពី  
 RNASS មុនពេលដំណើរការវិភាគតាមពិធីការស្តង់ដារ។

**3.4. ការរក្សាទុកស្លកនៅសីតុណ្ហភាពបន្ទប់**

នេះជាវិធីសាស្ត្រចាស់មួយដែលគេប្រើសម្រាប់រក្សាទុក  
 លើសំណាកទាំងមូល  
 ដែលមានគុណវិបត្តិសំខាន់គឺមិនអាចរក្សាទុកសរីរាង្គផ្សេងៗ  
 ស្រួយបានល្អ ដូចជា ស្លាប ជើង អង្កែន និង palps។  
 យ៉ាងណាក៏ដោយការសិក្សា proteomics ដោយប្រើ MALDI-  
 ToF នៅតែអាចអនុវត្តបានប្រសិនបើការដកទឹក  
 (dehydration) ត្រូវបានអនុវត្តនៅពេល fixation  
 ដោយប្រើសារធាតុដកសំណើមប្រភេទ silica gel។  
 ផ្ទុយទៅវិញ ការវិភាគសេនេទិចដែលផ្តោតលើ DNA  
 មានភាពលំបាកក្នុងសំណាកប្រភេទនេះ ព្រោះ DNA  
 ជាញឹកញាប់ត្រូវបានខូច  
 និងមានបរិមាណទាបដែលធ្វើឱ្យការវិភាគមានភាពស្លុក  
 ស្លាញជាងសំណាកថ្មី ឬសំណាកបង្កក  
 ជាពិសេសសម្រាប់ការសិក្សា nuclear genomes។  
 ទោះបីជាយ៉ាងណា បច្ចេកទេសសម័យថ្មីដូចជា museomics  
 អាចអនុវត្តលើសំណាកប្រភេទនេះបាន [34]។  
 ដោយហេតុនេះ  
 វិធីសាស្ត្ររក្សាទុកតាមរបៀបបែបនេះមិនត្រូវបានផ្តល់អ  
 នុសាសន៍ទេ លុះត្រាតែមិនមានជម្រើសផ្សេងៗ  
 វាអាចរួមបញ្ចូលជាមួយការរក្សាទុកបង្កក  
 ដោយដាក់បំពង់ទឹកកក-20°C ឬ -80°C។  
 បញ្ហាសំខាន់គឺការធានាបាននូវការ Mounting  
 អោយសមស្របទៅនឹងសំណាក  
 ឬផ្នែករាងកាយដែលចាំបាច់សម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញា  
 ណា។  
 ដើម្បីសម្រេចទៅបានការធ្វើការដកជាតិទឹកឡើងវិញគឺចាំ  
 បាច់។ យើងសុំផ្តល់អនុសាស្ត្រអោយប្រើសូលូស្យុង Triton X-  
 100។  
 រយៈពេលនៃការដកជាតិទឹកឡើងវិញអាចប្រព្រឹត្តទៅ២ឬ  
 ៣ម៉ោងរហូតដល់២ឬ៣ថ្ងៃដោយត្រូវត្រួតពិនិត្យជាប្រចាំ។

បន្ទាប់ពីការដកជាតិទឹកឡើងវិញទាំងស្រុងសំណាកត្រូវលា  
 ងក្នុងទឹកបីដងជាបន្តបន្ទាប់។

**3.5. ការរក្សាទុកលើ Filter papers**

អត្ថប្រយោជន៍សំខាន់នៃ filter papers  
 គឺស្ថេរភាពរយៈពេលវែងនៃ genomic DNA  
 ក្នុងកោសិកានៃសំណាក  
 ឬក្នុងរាងកាយទាំងមូលដែលមិនបានធ្វើ fixation  
 និងត្រូវបានស្លុក ឬក្នុងកោសិកាយាម  
 ដែលរក្សាទុកនៅសីតុណ្ហភាពបន្ទប់។ Filter paper  
 មានទំហំតូចដែលអាចផ្ទុកសំណាករាប់រយនៅសីតុណ្ហភាព  
 បន្ទប់ ក្នុងបរិមាណតូចស្មើប្រអប់តូចមួយ។ Matrix របស់  
 filter paper  
 ត្រូវបានបញ្ចូលសារធាតុដែលមានសមត្ថភាពធ្វើ  
 denaturation  
 លើភ្នាក់ងារបង្កជំងឺបណ្តាលឱ្យណាកនោះមិនត្រូវបានចាក់  
 ទុកជាហានិភ័យជីវសាស្ត្រ (non-biohazardous)  
 ហើយវាអនុញ្ញាតឱ្យរក្សាទុក  
 និងដឹកជញ្ជូនសំណាកដោយមិនចាំបាច់អនុវត្តវិធានការ  
 ពិសេសសម្រាប់សុវត្ថិភាពជីវសាស្ត្រ [68] ។

**4. ការកាត់ និងបំបែកសំណាក (dissection)**

ខុសពីសត្វល្អិតផ្សេងៗជាច្រើន  
 ដែលអាចកំណត់អត្តសញ្ញាណដោយផ្អែកលើលក្ខណៈខាង  
 ក្រៅដែលមើលឃើញបាន  
 លើសត្វល្អិតដែលរូបរាងទាំងមូលបានរៀបចំទុក (pinned in  
 toto) sand flies ត្រូវការ dissection និង Mounting  
 ដើម្បីសិក្សារចនាសម្ព័ន្ធរាងកាយសម្រាប់កំណត់ប្រភេទអោ  
 យបានត្រឹមត្រូវ។ ទោះវិធីសាស្ត្រនៃការរៀបចំ  
 និងបច្ចេកទេសនៃការ Mounting  
 ត្រូវបានជ្រើសរើសយ៉ាងដូចម្តេចក៏ដោយ  
 បច្ចេកទេសកាត់បំបែកដូចគ្នាត្រូវបានអនុវត្ត (រូបភាព  
 ២ និង ៣) (<https://zenodo.org/records/18198006>) ។

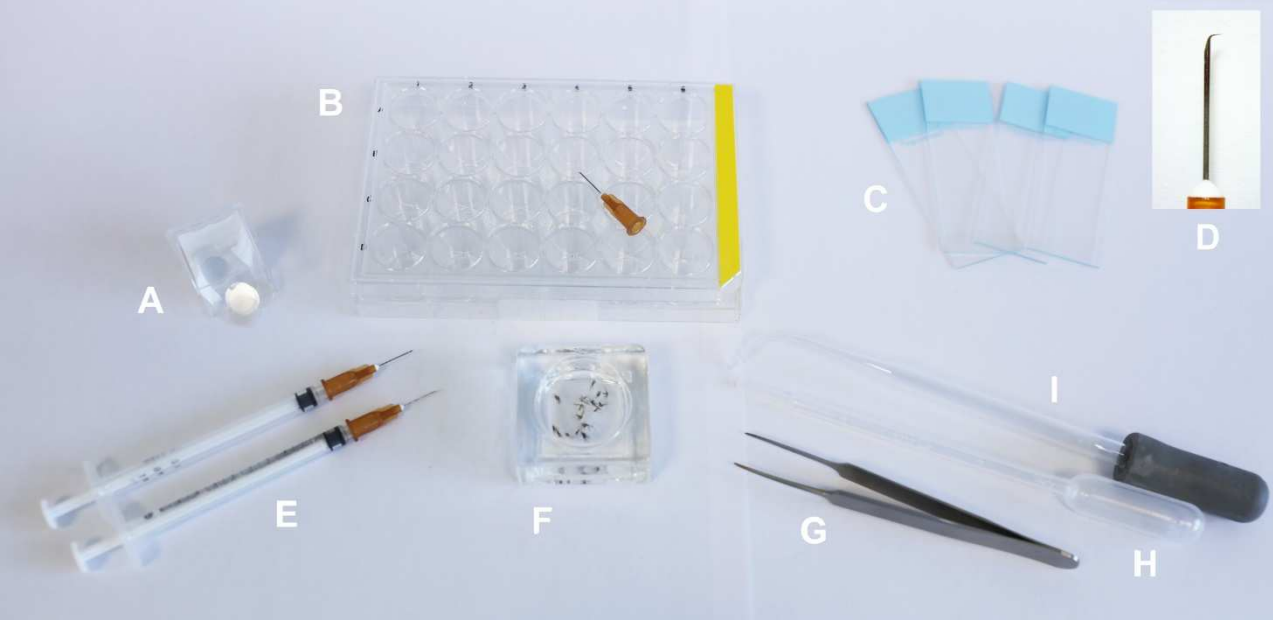
ការប្រើប្រាស់ Triton X100  
 សូលូស្យុងទឹកមិនមានអ៊ីយ៉ុង (non-ionic aqueous  
 solution)  
 ចំណាំ៖  
 ការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមទាក់ទងនឹងសំណាកដែល  
 ទើបតែចាប់បាន ឬសំណាកដែលរក្សាទុកក្នុងអាល់កុល។  
 អ្នកប្រមូលសត្វល្អិតភាគច្រើនមានសំណាកជាសត្វល្អិតដែល  
 បានរក្សាទុកស្លុក (សម្រាប់ប្រើប្រាស់ក្នុង MALDI-ToF)  
 រក្សាទុកក្នុងអាល់កុលរយៈពេលជាច្រើនឆ្នាំ។  
 ជារឿយអកុសល  
 សំណាកមួយចំនួនរក្សាទុកក្នុងអាល់កុលជាច្រើនឆ្នាំដែល  
 មិនអាចរក្សាសភាពដើមបានល្អ  
 ធ្វើឱ្យផ្តល់ផលវិបាកក្នុងការរៀបចំសម្រាប់ពិនិត្យក្រោមមី  
 ក្រូទស្សន៍។  
 បញ្ហាដែលកើតឡើងញឹកញាប់គឺការបំផ្លាញដោយមានបំ  
 ណែកផ្លាស្ទិចក្នុង សំណាកនោះ

ដោយសាររហូតនៃអាល់កុល។ ក្នុងករណីទាំងពីរខាងលើនេះ គ្មានជម្រើសអ្វីផ្សេងឡើយ ពីព្រោះសំណាកត្រូវនៅក្នុងអាល់កុលរយៈពេលយូរ ឬអាល់កុលស្ងួតពេញលេញ។ ដូច្នេះហើយទើបមានការណែនាំអោយប្រើប្រាស់សារធាតុបន្ថែមសំណើម (wetting agents) ដែលមិនមែនជាប្រភេទសាប៊ូខ្លាំង។ Triton X100 មានទម្រង់ជាសូលុយស្យុង មិនមានអ៊ីយ៉ុង (4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol solution ឬ t-octylphenoxypolyethoxyethanol, polyethylene glycol tert-octylphenyl ether) ដែលត្រូវបានប្រើយ៉ាងទូលំទូលាយក្នុងការសិក្សាកោសិកាសាស្ត្រនិងម៉ូលេគុលជីវឡា។

វាអនុញ្ញាតឱ្យឆ្លងស្រទាប់ស្បែកកោសិកា និងភ្នាស់ណឺយ៉ូ (cell and nuclear membranes) បានយ៉ាងងាយស្រួល។

ការប្រើប្រាស់ Triton X100 មិនមានអ៊ីយ៉ុង (កំហាប់ 0.5%)៖

- ដាក់សំណាកស្លឹកជាមួយអាល់កុលសុទ្ធ
- បន្ថែមបរិមាណ Triton X100 0.5% ដើម្បីឱ្យសំណាកទាំងមូលជ្រាមសំបកក្នុងសូលុយស្យុង
- ទុកក្នុងរយៈពេលចន្លោះប្រហែល ៥ នាទី រហូតដល់ជាច្រើនថ្ងៃ ពិនិត្យអោយទៀងទាត់រហូតដល់សំណាកទាំងអស់ត្រូវតែបែកចេញទាំងស្រុងក្នុងសូលុយស្យុង
- ដកសូលុយស្យុង Triton X100 និងជន្លូសជាមួយសូលុយស្យុងប៉ូតាស្យូមហ៊ីដ្រូកស៊ីត



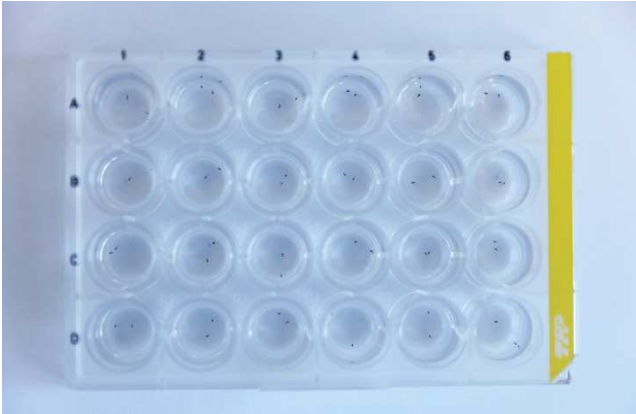
**រូបភាព ២៖ សម្ភារៈសម្រាប់ដាក់ Phlebotomine លើឡាម** A: ឡាម៉ែល ទំហំ ១០ ឬ ១២ មម B: មីក្រូផ្លេក ២៤ន្ទ និងម្ជុល (hooked needle) (បើអ្នកប្រើប្រាស់ clove oil ឬ Euparal® essence ដើម្បីរៀបចំ Phlebotomine ហាមប្រើ acrylic plates ពីព្រោះប្រតិកម្មគីមីអាចកើតឡើង និងបំផ្លាញសំណាក) C: កញ្ចក់ឡាមដែលសមស្របអាចសរសេរសញ្ញាសម្គាល់ D: ព័ត៌មានលម្អិតនៃមូសសោត E: មូសក្តាប់ជាមួយស៊ីរីន F: កញ្ចក់មើលម៉ោង ឬកំណត់ដូចម្តេចដើម្បីកាន់ Phlebotomine ដែលត្រូវដាក់ស្លាយ G: ជន្លូស Dumont forceps H: ពីប៉ែកច្បាស្ទិច I: ពីប៉ែកកញ្ចក់ដើម្បីងាយក្នុងការផ្ទេរសូលុយស្យុងទៅក្នុងរន្ធនីមួយៗ។

4.1. ក្បាល

Dissection អាចអនុវត្តដោយប្រើម្ហូបតូច ឬម្ហូបសម្រាប់ដោតសត្វល្អិត ក្រោមមីក្រូទស្សន៍ (រូបភាព ២ និង ៣។ ម្ហូបដែលប្រើញឹកញាប់រួមមាន៖ 26G x 1/2" (0.45 x 13 មម(, 30G x 1/2" (0.3 x 13 មម (ឬ 25G x 5/8" (0.5 x 16 មម។ ការរៀបចំសំណាកសម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ យ៉ាងហោចណាស់ ត្រូវកាត់បំបែកក្បាលចេញពីរាងកាយ ហើយ Mounting ដោយដាក់សំណាកក្នុងទីតាំងផ្នែក ventral ឡើងលើដើម្បីបង្ហាញ cibarium និង pharynx ខណៈដែល ផ្នែកទ្រូង និងពោះត្រូវដាក់ក្នុងទីតាំង lateral បន្ទាប់ពី dissection។ ការដាក់ផ្នែកក្បាលក្នុងទីតាំង ventro-dorsal ដើម្បីអោយ occipital foramen ត្រូវបានកំរងឡើងលើដើម្បីអាចសង្កេត cibarium បានដោយផ្ទាល់។ ដំណើរការវិភាគទៅកាន់ចនាសម្ព័ន្ធកាយវិភាគទាំងនេះ នឹងមានភាពងាយស្រួល ប្រសិនបើក្បាលត្រូវបានបំបែកចេញទាំងស្រុង។

4.2. ស្លាប និងទ្រូង

ស្លាបត្រូវតែដាក់ឱ្យរាបស្មើលើកញ្ចក់ឡាម។ ស្លាបនីមួយៗអាចបំបែកចេញពីគល់ ហើយដាក់ដោយឡែក ឬអាចដាក់តែមួយ ដោយទុកស្លាបមួយទៅតភ្ជាប់ជាមួយទៅនឹងទ្រូង។ ក្នុងការវិភាគ geometric morphometry គឺចាំបាច់ត្រូវកំណត់ និងដាក់ស្លាកសម្គាល់រឿងស្លាបស្តាំ និងទ្រូងឱ្យត្រឹមត្រូវ មុនពេល Mounting។ ផ្នែកទ្រូង ត្រូវបែងចែកជាច្រើនផ្នែក ដែលផ្នែកនីមួយៗផ្ទុកព័ត៌មានសំខាន់សម្រាប់វិទ្យាសាស្ត្រ នៃការកំណត់ប្រភេទ [20, 64] ។ ជាទូទៅ វាត្រូវបានដាក់ក្នុងទីតាំង lateral ដើម្បីអនុញ្ញាតឱ្យពិនិត្យ chetotaxy និងការបែងចែកពណ៌។ វត្តមានស្នាមរោម) scars of bristles នៅតំបន់ជាក់លាក់នៃផ្នែកទ្រូងអាចប្រើសម្រាប់បែងចែកប្រភេទខ្លះៗក្នុងពួក Brumptomyia។ ការបែងចែកពណ៌អាចប្រើសម្រាប់កំណត់អត្តសញ្ញាណ Phlebotomine នៅតាមតំបន់ Neotropical នៅកម្រិតពួក (ឧ. Bichromomyia), សេរីនេប្រភេទសត្វ (ឧ. Pintomyia) ឬកម្រិតប្រភេទក្នុងកម្រិតពួកដូចគ្នា) ឧ. Micropygomyia, Nyssomyia, Psathyromyia, និង Psychodopygus) [20] ។ ដូច្នេះ ប្រសិនបើផ្នែកទ្រូង មិនត្រូវបានប្រើសម្រាប់វិភាគម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ វាក៏ត្រូវបាន Mounting ដោយប្រុងប្រយ័ត្ន ដើម្បីជៀសវាងការខូចខាត។ គួរបញ្ជាក់ថាមិនមែនអាំងតង់ស៊ីតេនៃពណ៌ដែលមានសារៈសំខាន់ទេ ប៉ុន្តែជាការបែងចែកពណ៌លើ ផ្នែកទ្រូង ទាំងមូល។ ដូច្នេះ ដំណើរការនៃការធ្វើអោយសំណាកក្តៅ មិនអាចបំបាក់សារធាតុពណ៌ ឬលំនាំពណ៌ឡើយ។



រូបភាព ៣៖ មីក្រូផ្នែក ២៤ រន្ធ ដែលរន្ធនីមួយៗផ្ទុកផ្នែកក្បាលនិងកងចុងក្រោយនៃ ផ្នែកពោះនៃ Phlebotomine

4.3. សេរីវិភាគបន្តពូជ (Genitalia)

ត្រូវប្រុងប្រយ័ត្នជាពិសេសនៅពេលដាក់សេរីវិភាគបន្តពូជ ទាំងភេទឈ្មោល និងភេទញី ព្រោះវាមានសារៈសំខាន់យ៉ាងខ្លាំងសម្រាប់កំណត់ ពួក, អនុពួក និង ប្រភេទ។ នៅក្នុងភេទទាំងពីរ សេរីវិភាគបន្តពូជមានលក្ខណៈជាគូរ (paired structures)។

4.3.1. សត្វឈ្មោល

សេរីវិភាគបន្តពូជឈ្មោលស្ថិតនៅផ្នែកខាងក្រៅ) external genitalia) មានសមាសភាពជាគូ forceps ដែលនីមួយៗរួមមាន gonocoxite-gonostyle articulation នៅផ្នែក dorsal និង epandrial lobe នៅផ្នែក ventral។ Gonostyle មាន spines ហើយពេលខ្លះមាន setae ដែលត្រូវអាចរាប់ចំនួនបាន ហើយទីតាំងដុះរបស់វាត្រូវតែអាចមើលឃើញបានយ៉ាងច្បាស់។ វាសំខាន់ណាស់ក្នុងការសង្កេតដោយយកចិត្តទុកដាក់លើ ផ្នែកខាងក្នុងរបស់ gonocoxite ដែលអាចមានរោមសរសៃដុះជាប់គ្មានគល់) sessile setae) ឬរោមដែលដុះនៅលើគល់) tubercle) [22]។

សហការីដែលមានបទពិសោធន៍គិតគូរក្នុង dissection សំណាក អាចអនុវត្ត Mounting តាមទិស lateral ដោយមិនបំបែកសេរីវិភាគបន្តពូជចេញពីចុងនៃផ្នែកពោះ: (<https://zenodo.org/records/18311158>)។ ក្នុងករណីនេះការត្រួតស៊ីគ្នានៃផ្នែកទាំងពីរនៃសេរីវិភាគបន្តពូជអាចធ្វើឱ្យពិបាកក្នុងការរាប់រោមសរសៃខាងក្នុងរបស់ gonocoxite ជាដើម ប៉ុន្តែវិធីនេះជៀសវាងការធ្វើឱ្យខូចខាតដល់សេរីវិភាគបន្តពូជតាមរយៈ dissection ហរាជយ។

សហការីដែលមានបទពិសោធន៍ច្រើនអាចព្យាយាមបើកសេរីវិភាគបន្តពូជជាពីរដើម្បីញែកពួកវាចេញពីគ្នា។ ដើម្បីសម្រេចបាននេះ ត្រូវដាក់ចុងម្ហូបដែលបានកាត់ជាវាងទ្រេត (កាត់ចូលទៅ

ដោយផ្តាច់ចេញ និងមិនចាំបាច់កាត់សរីរាង្គបន្តពូជទាំងស្រុងដើម្បីញែក ផ្នែកក្នុង gonocoxite-gonostyle (<https://zenodo.org/records/18311158>) ការប្រើវិធីនេះ ធ្វើអោយការសង្កេតលើផ្លែខាងក្នុងរបស់វាយ៉ាងងាយស្រួល ។ Mounting នេះក៏ជួយសម្រួលដល់ការសង្កេតមើល parameres និងស្រោម parameral sheaths ដែលលែងត្រួតស៊ីគ្នា។ សម្រាប់ Mounting ពឹងហៀង) lateral mounting) ដែលធ្វើឱ្យសរីរាង្គត្រួតស៊ីគ្នា ដូចនេះសំណាកត្រូវតែធ្វើឱ្យស្អាត (perfectly cleared) ជាមុនសិន។

**4.3.2. សត្វញី (Females)**

ប្រព័ន្ធសរីរាង្គបន្តពូជញីស្ថិតនៅខាងក្នុង) internal genital apparatus) ដែលបង្កើតឡើងដោយថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae)។ ប្រសិនបើមិនមាន dissection វាត្រូវតែសង្កេតតាមរយៈ teguments ដោយដាក់ abdomen ក្នុងទីតាំង ventral។

មិនថាជ្រើសរើស mounting medium ប្រភេទណាក៏ដោយ ថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae) ជាទូទៅអាចសង្កេតបានច្បាស់ប្រសិនបើវាមិនមានផ្ទៃរលោង) smooth) ហើយត្រូវបានធ្វើអោយស្អាត។ ទោះយ៉ាងណាក៏ការសង្កេតថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae) ដែលមានជញ្ជាំងស្តើង និងរលោងអាចជួបបញ្ហានៅក្នុង medium ដែលមានសមត្ថភាពចំណាំងផ្លាគតាត្រី) refractility) ទាប។

លើសពីនេះ ការសង្កេតមើលគល់នៃបំពង់ថង់ផ្ទុកទឹកកាម) base of the spermathecal ducts) មានសារៈសំខាន់ខ្លាំងសម្រាប់កំណត់ប្រភេទដូចជាក្នុង subgenus Larrousius [35, 37, 38] ដែលជាភ្នាក់ងារចម្បងសំខាន់នៃ *Leishmania infantum* នៅតាមបណ្តាប្រទេសមួយចំនួននៃ Old World។ បើគ្មានការសង្កេតនេះ ការកំណត់អត្តសញ្ញាណសំណាកមិនអាចអនុវត្តបាន។

ដើម្បីដោះស្រាយបញ្ហានៃការសង្កេតទាំងនេះ គួរបំបែក genital furca-នៃថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី) spermathecae) ចេញពី abdomen ពេលធ្វើmounting (<https://zenodo.org/records/18311106>) ។ ថង់ផ្ទុកទឹកកាមជាទូទៅពិបាកសង្កេតក្នុងអំឡុងពេលកាត់បំបែក ប៉ុន្តែ genital furca មានភាពងាយស្រួលក្នុងការរកឃើញ។ ដោយសារ spermathecal ducts លូតលាស់ចូលទៅក្នុង genital furca ការបំបែក furca

នេះជាទូទៅអនុញ្ញាតឱ្យបំបែកថង់ផ្ទុកទឹកកាម)spermathecae) បានផងដែរ។

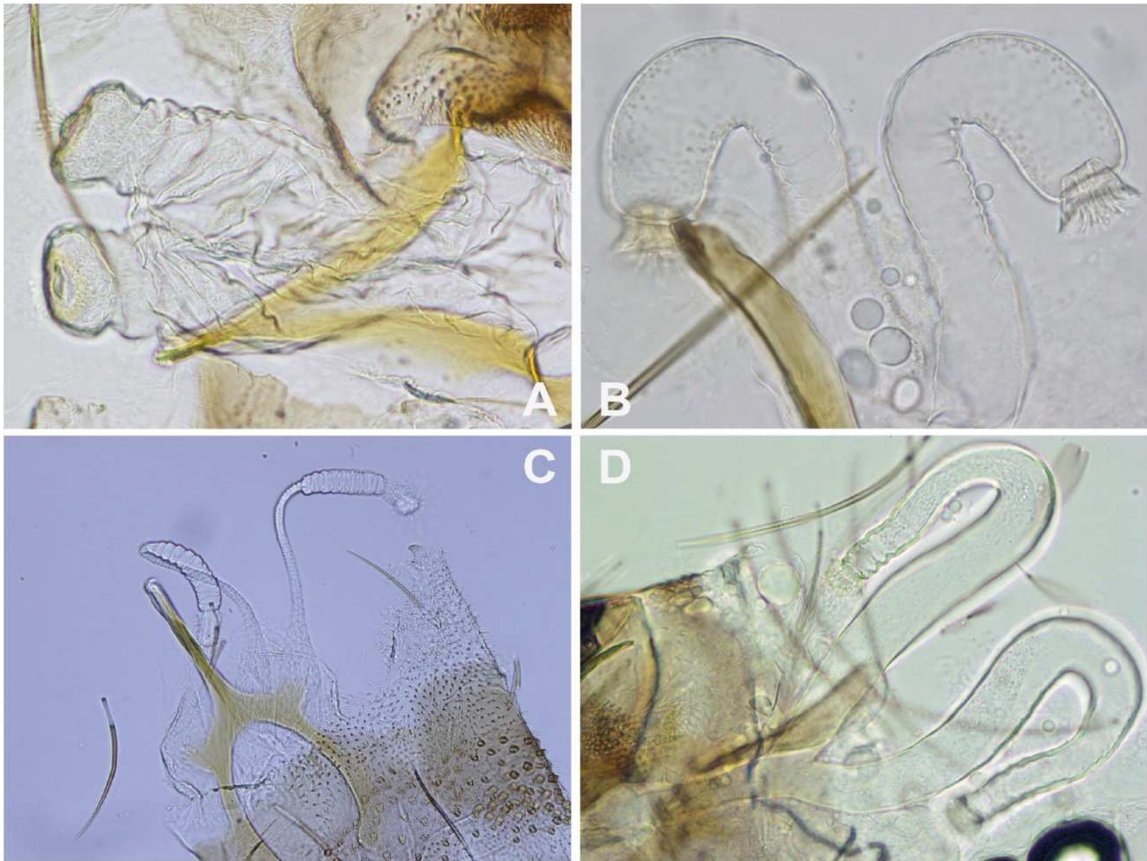
ប្រសិនបើ ថង់ផ្ទុកទឹកកាម)spermathecae) ត្រូវបានកាត់ដោយអចេតនាក្នុងអំឡុងដំណើរការវិភាគ វាមិនបាត់បង់ឡើយ ហើយនៅតែអាចសង្កេតបាននៅក្នុង abdominal integuments (រូបភាព ៤)

**4.4. Dissection ក្រពះពោះវៀនកណ្តាល (Midgut dissection) សម្រាប់ញែកយក Leishmania**

Dissection ប្រព័ន្ធរំលាយអាហារ (digestive tract) មានសារៈសំខាន់ជាអនុវត្តន៍សម្រាប់ការរកឃើញ និងញែកយក *Leishmania* នៅក្នុង Phlebotomine ភេទញី (female sand flies) ។ នីតិវិធីនេះអាចអនុវត្តបានទាំងក្នុងបរិបទfield condition (field setting) និងមន្ទីរពិសោធន៍ (laboratory setting) ដើម្បីវាយតម្លៃសមត្ថភាពចម្លងជម្ងឺ (vectorial competence) ។

ការផ្តល់អនុសាសន៍ឱ្យប្រើសត្វភេទញីដែលទើបតែបាន ធ្វើការសម្លាប់ថ្មីៗ ត្រូវលាងសត្វភេទញីដោយទឹក ឬសូលុយស្យុងសាលីន (saline solution) ដែលលាយជាមួយសាប៊ូស្រាល ដើម្បីយករោមលើសចេញ។ ជំហាននេះជួយរក្សាលក្ខខណ្ឌនៃភាពស្អាតគ្មានមេរោគ (aseptic conditions) សម្រាប់ការញែកយក *Leishmania* ខណៈពេលដែលថែរក្សា លក្ខណៈរូបសាស្ត្រ ដែលត្រូវការសម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ។

ដើម្បីស្វែងរក និងញែកយក *Leishmania* ត្រូវបំបែកក្រពះពោះវៀនកណ្តាល (dissect midgut) ដោយប្រុងប្រយ័ត្នហើយដាក់វាទៅក្នុងចំណុចតែមួយនៃសូលុយស្យុងសាលីនកំហាប់0.9% (sterile saline solution, 0.9% NaCl)។ បន្ទាប់ពីសង្កេតឃើញប៉ារ៉ាស៊ីតដែលមានចលនា (motile parasites) ក្រោមមីក្រូទស្សន៍ (កម្រិតពង្រីកប្រហែល ~200x) ត្រូវប្រើ insulin syringe ឬ micropipette ដើម្បីផ្ទេរពួកវាទៅក្នុងថ្នាំលបណ្តុះ



**រូបភាព ៤:** ថង់ផ្គុកទឹកកាម(spermathecae) ដែលបានកាត់បំបែក និងការMountingក្នុង Marc-André fluid ពីសំណាកស្រស់ៗ A: *Idiophlebotomus longiforceps* (ឡាវ); B: *Sergentomyia minuta* (បារាំង); C: *Phlebotomus ariasi* (បារាំង); D: *Sergentomyia anodontis* (ឡាវ)

(សម្រាប់ព័ត៌មានលម្អិតបន្ថែម សូមមើលជំពូក 4.4.3)។ ត្រូវដាក់ក្បាលនិងសេរីវាងបន្តរព្យាបាលដោយផ្ទាល់ក្នុង Marc-André fluid ដើម្បីធ្វើអោយសំណាកថ្លា (clearing)។ **សំខាន់:** មិនត្រូវអនុញ្ញាតឱ្យ Marc-André fluid ប៉ះពាល់ជាមួយ *Leishmania* នោះឡើយទាំងដោយផ្ទាល់ ឬដោយប្រយោលតាមរយៈឧបករណ៍ ឬម្ហូប ពីព្រោះវាអាចធ្វើអោយប៉ះពាល់ស៊ីតជាប់។ Dissection Phlebotomine ភេទញីអាចអនុវត្តលើឡាមតែមួយ ឬពីរ; ជម្រើសទាំងពីរមានអត្ថប្រយោជន៍ និងកម្រិតកំណត់ផ្ទាល់ខ្លួន (រូបភាព ៥; <https://zenodo.org/records/18311154>) ។

**4.4.1. វិធីសាស្ត្រ Two-slides method**  
 ជម្រើសទីមួយ គឺអនុវត្តលើឡាមពីរផ្សេងគ្នា៖ ឡាមទីមួយមានសូលុយស្យុងសាលីន (sterile saline) សម្រាប់បំបែកក្រពះពោះវៀនកណ្តាល (dissect midgut)

និងឡាមទីពីរសម្រាប់ដាក់ក្បាល និងថង់ផ្គុកទឹកកាមញី (spermathecae) ក្នុង Marc-André fluid។  
 ទោះយ៉ាងក្នុងលក្ខខណ្ឌfield conditionទាំងមានមនុស្សពីរ ឬបីនាក់ធ្វើការបំបែក Phlebotomine ហើយផ្ទេរសំណាកទៅអ្នកស្រាវជ្រាវដើម្បីទទួលខុសត្រូវលើ ការកំណត់ប្រភេទ និងវាយតម្លៃការឆ្លង *Leishmania* នៅក្នុងក្រពះពោះវៀនកណ្តាល (midgut) ។ ការគ្រប់គ្រងឡាមទាំងពីរអាចបង្កបញ្ហាដល់ការតាមដានសំណាក (sample traceability) និងជាពិសេសធ្វើឱ្យពិបាកកំណត់ដោយភាពប្រាកដថា Phlebotomine ណាដែលមានការឆ្លងប្រសិនបើរកឃើញក្រពះពោះវៀនកណ្តាលវិជ្ជមាន (<https://zenodo.org/records/18311154>) ។

4.4.2. វិធីសាស្ត្រ Single-slide method

ការប្រើស្លាយតែមួយដោយស្រួលក្នុងការតាមដានលទ្ធផលបានត្រឹមត្រូវ តែក៏ត្រូវអនុវត្តវិធានយ៉ាងប្រុងប្រយ័ត្ន។

ដើម្បីបង្កើនភាពស្អាតអាសេបទិក អ្នកអនុវត្តត្រូវសម្អាតដៃជាប្រចាំជាមួយ hydroalcoholic gel។ ត្រូវប្រើកញ្ចក់ឡាមដែលមិនមានផ្ទៃមាត់រលោង និងកញ្ចក់ឡាមដែលរាងការ៉េ) 22 x 22 មម (ដោយរឹចខ្ទប់ជាមួយក្រដាសអាលុយមីញ៉ូម រួចធ្វើការសម្អាតមេរោគដោយកម្ដៅស្លឹក) Poupinel oven) រួមទាំងម្ជុលផងដែរសម្រាប់ dissection នីមួយៗ) សំណើ: 25G Ø 0.5 មម x 16 មម(។

Phlebotomine ត្រូវដាក់ក្នុងដំណក់សូលុយស្យុងអំបិលគ្មានមេរោគនៅចំកណ្តាលកញ្ចក់ឡាម។ កាត់ក្បាលរបស់វា បន្ទាប់មកដាក់ស្នាមរវាងផ្នែកកងខាងក្រោយ) tergites) និងផ្នែកកងខាងក្រោយ) sternites) ទី៦ និងទី៧ ដោយមិនត្រូវកាត់ដល់ពង់រំលាយអាហារឡើយ )អាចកាត់ខ្ទប់ជាងនេះ: ប្រសិនបើពង់រំលាយផ្នែកទឹកកាមញី) spermathecae) រីឯ (។

បន្ទាប់មក ត្រូវទប់ផ្នែកទ្រូងរបស់វាជាមួយម្ជុលមួយ ហើយទាញចុងពោះខាងក្រោយថ្នមៗជាមួយម្ជុលមួយទៀត ដើម្បីទាញយកក្រពះពោះវៀនចេញ។ ប្រសិនបើមិនជោគជ័យ អាចបាក់ម្ជុលបិទចុង នៃផ្នែក ហើយទាញបំពង់រំលាយអាហារពីផ្នែកខាងមុខរបស់វា។ ប្រសិនបើបរាជ័យម្ដងទៀត ត្រូវទាញយកក្រពះពោះវៀនដោយការយកចេញនូវសំណល់ ស្បែកខាងក្រៅ) tegument) ជុំវិញវាឱ្យបានច្រើនតាមដែលអាចធ្វើបាន។ នៅពេលយកក្រពះពោះវៀនចេញរួច ត្រូវញែកកងនៃផ្នែកពោះចុងក្រោយដោយកាត់បំពង់រំលាយអាហារ។

បន្ទាប់មកដាក់ក្រពះពោះវៀនក្នុងដំណក់សូលុយស្យុងសាលីនគ្មានមេរោគថ្មីមួយ ដែលដាក់នៅផ្នែកម្ខាងនៃកញ្ចក់ឡាម ហើយបិទថ្នមៗជាមួយកញ្ចក់ឡាមដែលគ្មានមេរោគ។ ផ្ទេរផ្នែកក្បាល និងកំណត់កងផ្នែកពោះចុងក្រោយទៅកាន់ដំណក់តូចមួយនៃសូលុយស្យុង Marc-André ដែលដាក់នៅចុងម្ខាងទៀតនៃកញ្ចក់ឡាម ដោយធានាថាគ្មានប៉ះពាល់ជាមួយ Leishmania ឡើយ។ ដាក់ក្បាលឱ្យបានត្រឹមត្រូវ) occipital foramen បែរមុខឡើងលើ (ហើយញែកថង់ផ្នែកទឹកកាមញី) spermathecae) ជាមួយ genital furca ដូចបានចង្អុលបង្ហាញខាងលើ ជាមួយឡាមដែលមូល) Ø ១២ ម.ម, កុំប្រឡងជាមួយឡាមដែលកាន់មេរោគ(។ ក្រោមឆ្អឹង Phlebotomine និងស្លាប់ដែលនៅសល់ត្រូវទុកក្នុងដំណក់សូលុយស្យុងសាលីននៅចំកណ្តាលឡាម )[https://zenodo.org/records/\(18311154](https://zenodo.org/records/(18311154) ។

ក្នុងករណីមានលទ្ធផលវិជ្ជមាន ឬសម្រាប់ការស្វែងយល់អំពីការសិក្សាកំណត់ប្រភេទ (taxonomic exploration) គេអាចរក្សាទុកផ្នែកទ្រូង និងពោះសម្រាប់ការសិក្សាជីវមូលេគុល ឬប្រើតេស្តមីក ហើយស្លាប់អាចត្រូវបានគេរៀបចំក្នុង aqueous medium។ ដើម្បីធ្វើការរៀបចំស្លាប់នោះអោយបានល្អ បរិមាណលើសនៃសូលុយស្យុង Marc-André អាចត្រូវបានជំនួសដោយ aqueous mounting medium ដូចជា chloral gum = Hoyer ឬប្រភេទផ្ទាល់ដែលមានសាមាសធាតុប៉ូលីវីនីលអាល់កុល )polyvinyl alcohol-based medium)។ វីដេអូលម៉ូតដែលបង្ហាញពីនីតិវិធីទាំងនេះ អាចរកបាន )ការធ្វើវះកាត់យកក្រពះពោះវៀនកណ្តាលរបស់ Phlebotomine ៖ <https://zenodo.org/records/18303014> និងការធ្វើវះកាត់យកក្រពះពោះវៀនទឹកមាត់របស់ Phlebotomine ៖ <https://zenodo.org/records/18302850> ដូច្នេះពួកវានឹងមិនត្រូវបានពន្យល់នៅទីនេះទេ។

4.4.3. ការញែកយក និងការបណ្តុះ Leishmania ពីក្រពះពោះវៀន Phlebotomine

ការញែកយកប៉ារ៉ាស៊ីតពីសត្វភេទញីដែលមានការឆ្លង គឺជានីតិវិធីស្មុគស្មាញនឹងទាមទារជំនាញខ្ពស់ ហើយគួរអនុវត្តស្មារតីលើសំណាកគ្មានប៉ារ៉ាស៊ីតជាមុន។ ក្រោយ dissection ក្រពះពោះវៀនរួចត្រូវផ្ទេរទៅក្នុង sterile saline (0.9%) ឬ Locke's solution សម្រាប់លាង 4]។ បន្ទាប់មក អាចអនុវត្តពីរវិធី: i) ពិនិត្យក្រោម light microscope ដើម្បីសង្កេតដំណក់កាលផ្សេងៗនៃ Leishmania promastigotes និង ទីតាំងរបស់វា ជាពិសេសនៅ stomodeal valve ii) បើកក្រពះពោះវៀនដើម្បីឱ្យ promastigotes ចេញដោយស្រួលសម្រាប់ការបណ្តុះច្រើន] 4]។

នៅfield condition ការរកឃើញសត្វដែលមានការឆ្លងរោគគឺកម្រមាន ហេតុនេះការអនុវត្តជាប្រចាំនឹងបង្កើនឱកាសជោគជ័យ។ ប្រសិនបើសង្កេតឃើញវិជ្ជមាន Leishmania ត្រូវប្រើម្ជុលដែលសម្អាតមេរោគរួចហើយបាញ់សូលុយស្យុង សាលីនបន្តិចជុំវិញឡាមដែល រួចដកយកឡាមដែលថ្នមៗ។ ការបំបែកក្រពះពោះវៀនត្រូវប្រុងប្រយ័ត្ន និងឆាប់រហ័ស ដើម្បីបញ្ចេញប៉ារ៉ាស៊ីតទៅក្នុង saline ។ ប្រើ micropipette 100 μL ឬ tuberculin syringe ប្រមូលប៉ារ៉ាស៊ីត ហើយ inoculate ទៅក្នុងផ្ទាលបណ្តុះដែលបានដាក់ស្លាកសម្គាល់ត្រឹមត្រូវ។

ការបណ្តុះ in vitro នៃ Leishmania promastigotes ប៉ារ៉ាស៊ីតត្រូវបានញែកទៅក្នុង SNB-9 blood agar slopes ឬ Novy, Mc Neal, Nicolle (NNN) solid medium ដែលគ្របដោយ sterile alpha-MEM ឬ M199 medium បន្ថែម 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% BME vitamins, 2% sterile human urine (តម្រងដោយ syringe filter Filtropur® S 0.2 μm), និងប្រភេទថ្នាំផ្សះដូចជា amikacin 250 μg/mL (ឬ

gentamicin 50 µg/mL ឬលាយ L-glutamine 200 mM-penicillin 10,000 U-streptomycin 10 mg/mL)។ បន្ទាប់ពី ៣ ថ្ងៃប្រសិនបើគ្មានការឆ្លងមេរោគពីខាងក្រៅ (contamination) ការបណ្តុះត្រូវផ្ទេរទៅក្នុងម្ជុលបង្កកហើយរក្សាទុកនៅ 80°C រយៈពេល ១-២ ឆ្នាំ ឬក្នុងនីត្រូសែនរាវ -196°C សម្រាប់ការរក្សាទុករយៈពេលវែង] 7]។

**4.5. ក្រពេញទឹកមាត់**

ការរកកាត់យកក្រពេញទឹកមាត់ Phlebotomine sand flies គឺជាបច្ចេកទេសមូលដ្ឋានសម្រាប់សិក្សាអន្តរកម្មរវាងភ្នាក់ងារចម្លងរោគនិងភ្នាក់ងារបង្ករោគជាពិសេសសម្រាប់ការរកឃើញវីរុសអាហ្វូ (arboviruses) ដូចជា Phlebovirus (ឧទាហរណ៍ Toscana virus) [44, 75]។ ដោយសារតែទំហំដុំតូចរបស់ Phlebotomine នីតិវិធីនេះទាមទារសុក្រឹតភាពខ្ពស់ក្រោមមីក្រូទស្សន៍ស្តេរ៉ូ (stereomicroscope) ដោយប្រើដង្ហៀបចាប់សត្វល្អិត ឬ ម្ជុលមានមុខតូច ដើម្បីបំបែកយកក្រពេញទឹកមាត់ដែលមានសភាពទន់ ដោយមិនបង្កឱ្យបែកបាក់ ឬ ការឆ្លងមេរោគពីខាងក្រៅ (https://zenodo.org/records/18302850) [51, 61]។ ការរក្សារូបភាពពេញលេញនៃក្រពេញមានសារៈសំខាន់ខ្លាំង ដើម្បីធានាភាពទុកចិត្តបាននៃការវិភាគម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រនៅដំណាក់កាលបន្ទាប់។ បន្ទាប់ពីដកចេញក្រពេញទឹកមាត់អាចត្រូវបានកិនបំបែក (homogenized) ហើយធ្វើតេស្តតាមរយៈ RT-PCR, qPCR ឬវិធីសេរ៉ូសាស្ត្រ (immunoassays) ដើម្បីរកវិញមាន RNA របស់វីរុស ឬ អង់ទីហ្វែន] 12]។ ការរកឃើញវីរុសនៅក្នុងក្រពេញទឹកមាត់ មិនមែនត្រឹមតែនៅក្នុងក្រពះពោះវៀន ឬហេមូស៊ីល (hemocoel) ប៉ុណ្ណោះទេ បញ្ជាក់ថាភ្នាក់ងារបង្ករោគបានបញ្ចប់រយៈពេលបង្កកំណើតខាងក្រៅ) extrinsic incubation period) ហើយអាចចម្លងបានក្នុងអំឡុងពេលបីគណៈម] 7]។ ដំណើរការបំបែក (dissection)

មានភាពស្មុគស្មាញខាងបច្ចេកទេស ដោយសារទំហំតូចរបស់ក្រពេញទឹកមាត់ Phlebotomine ដែលទាមទារជំនាញខ្ពស់ដើម្បីជៀសវាងការខូចខាតសំណាក] 1, 51]។ បន្ថែមពីនេះ បរិមាណវីរុសអាចមានកម្រិតទាប ដូច្នេះទាមទារមាន sensitivity ខ្ពស់ ដូចជា nested PCR ឬបច្ចេកវិទ្យាកម្រិតខ្ពស់ high-throughput sequencing [54]។ ហានិភ័យនៃការឆ្លងមេរោគពីខាងក្រៅក៏បញ្ជាក់ពីតម្រូវការអនុវត្តបច្ចេកទេសសម្អាតមេរោគ) aseptic techniques) យ៉ាងតឹងរឹងផងដែរ។ លើសពីឧបសគ្គបច្ចេកទេសក្នុងជីវសាស្ត្រក៏មានឥទ្ធិពលលើភាពជោគជ័យនៃការរកឃើញផងដែរ ដោយសមត្ថភាពចម្លងរបស់ភ្នាក់ងារចម្លង (vector competence) ខុសគ្នាក្នុងចំណោមប្រភេទ Phlebotomine ហើយអត្រាឆ្លងប្រែប្រួលទៅតាមលក្ខខណ្ឌអេកូសាស្ត្រ និងរដូវកាល] 33, 61]។

ការរកឃើញវីរុសក្នុងក្រពេញទឹកមាត់ផ្តល់នូវព័ត៌មានសំខាន់សម្រាប់ការវាយតម្លៃហានិភ័យនៃការចម្លងជួយឱ្យអនុវត្តការតាមដាន និងវិធានការគ្រប់គ្រងដោយមានគោលដៅច្បាស់លាស់] 15]។ ឧទាហរណ៍ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ Toscana virus ក្នុង Phlebotomine នៅតំបន់មានជម្ងឺរាវដាលបានជួយឱ្យកែលម្អវិធីធ្វើរោគវិនិច្ឆ័យ និងការជូនដំណឹងទៅសុខាភិបាលសាធារណៈ] 18]។ បន្ថែមទៀត ការសិក្សាអន្តរកម្មរវាងវីរុស និងទឹកមាត់អាចបង្ហាញគោលដៅថ្មីសម្រាប់វាក់សាំង ឬវិធីព្យាបាលដែលទប់ស្កាត់ការបញ្ជូនរោគ] 15, 18]។

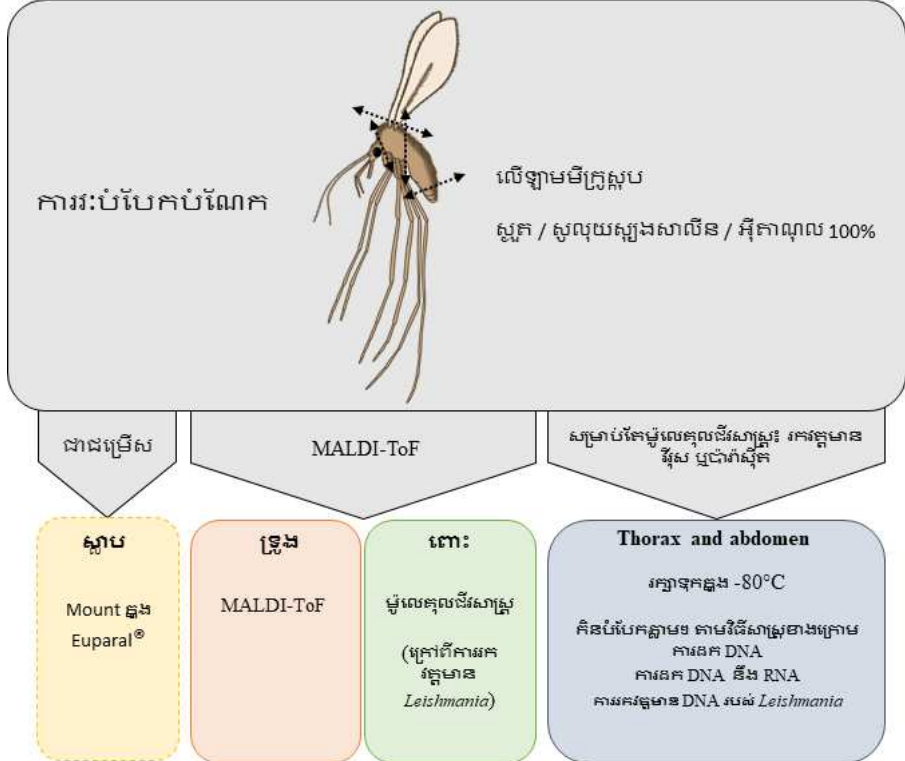
ក្រពេញទឹកមាត់ Phlebotomine ក៏អាចប្រើជាប្រភពអង់ទីហ្វែនសម្រាប់វាស់វែងអង់ទីករ ប្រឆាំងនឹងទឹកមាត់ Phlebotomine ដោយប្រើវិធីសេរ៉ូសាស្ត្រ ELISA។ វិធីសាស្ត្រនេះអនុញ្ញាតឱ្យវាយតម្លៃកម្រិតការបំបែករបស់ Phlebotomine ដោយវាយតម្លៃប្រសិទ្ធភាពនៃវិធានការគ្រប់គ្រងភ្នាក់ងារចម្លង] 25] និងហានិភ័យនៃការចម្លង Leishmania [40]។



បន្ទាប់ពីធ្វើការសម្អាត) clearing)។ ផ្នែកចម្បងនៃពោះ (ដោយគ្មាន ថង់ផ្កកទឹកកាមញី) spermathecae) ត្រូវដាក់ក្នុងបំពង់ទឹក Eppendorf® ហើយរក្សាទុកនៅសីតុណ្ហភាព- រហូតដល់ពេលធ្វើវិភាគបន្ថែម។

សញ្ញាសម្គាល់ហ្សេន) genetic markers) ដែលប្រើជាទូទៅសម្រាប់កំណត់អត្តសញ្ញាណប្រភពឈាម ដូចជា PNOG [5, 30, 50], CytB [67] ឬ COI [13] ត្រូវបានបង្កើត និងពិពណ៌នាយ៉ាងទូលំទូលាយក្នុងអត្ថបទវិទ្យាសាស្ត្រ ដូច្នោះមិនត្រូវបានពន្យល់លម្អិតបន្ថែមនៅក្នុងអត្ថបទ នេះទេ) រូបទី ៦)។ ជម្រើសផ្សេងទៀត សម្រាប់កំណត់អត្តសញ្ញាណឈាមជួលអាចប្រើបច្ចេកទេស MALDI-ToF peptide mapping [31]។ ការសាកល្បងពិសោធន៍បានបង្ហាញថាបច្ចេកទេសនេះអាច កំណត់អត្តសញ្ញាណប្រភពឈាមបានក្នុងរយៈពេលយូរជាង វិធីសាស្ត្រផ្សេងបន្ទាប់ពីការប៊ីតឈាម ដូច្នោះវាជាជម្រើសសមស្របសម្រាប់វិភាគលើសត្វព្រីដែលបំពេញដោយឈាម

ពេញដោយឈាម ហើយបង្ហាញការរំលាយឈាមកម្រិតខ្ពស់ជាង។ សំណាកក្នុងរក្សាទុកនៅ- 20°C ឬ 4°C ជាអាទិភាព ប៉ុន្តែយើងអាចទទួលបានលទ្ធផលល្អពីសំណាកដែលរក្សាទុក នៅសីតុណ្ហភាពបន្តិចក្នុងរយៈពេលខ្លីផងដែរ។ ពោះរបស់ព្រីដែលបំពេញដោយឈាម ត្រូវបំបែកចេញពីផ្នែកផ្សេងនៃរាងកាយមុនពេលធ្វើវិភាគ ហើយធ្វើការកិនបំបែក) homogenized) ក្នុងទឹកប៊ីត (distilled water)។ ផ្នែករាងកាយដែលនៅសល់របស់ Phlebotomine អាចប្រើបន្តសម្រាប់វិភាគម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ និងរូបសាស្ត្រផ្សេងទៀត។ បន្ទាប់ពីសម្របសម្រួល (aliquot) ពីការកិនបំបែកសម្រាប់ធ្វើ MALDI-ToF peptide mapping ផ្នែកដែលនៅសល់អាចប្រើសម្រាប់ប្រែប្រួល DNA ដើម្បីបញ្ជាក់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណប្រភពឈាម និង/ឬ រកវិញមាន Leishmania sp.។ សរុបជារួម រយៈពេលសរុបនៃការរៀបចំសំណាក និងការវិភាគគឺខ្លីជាងបើប្រៀបធៀបនឹងបច្ចេកទេសម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រដែលផ្អែកលើ DNA។

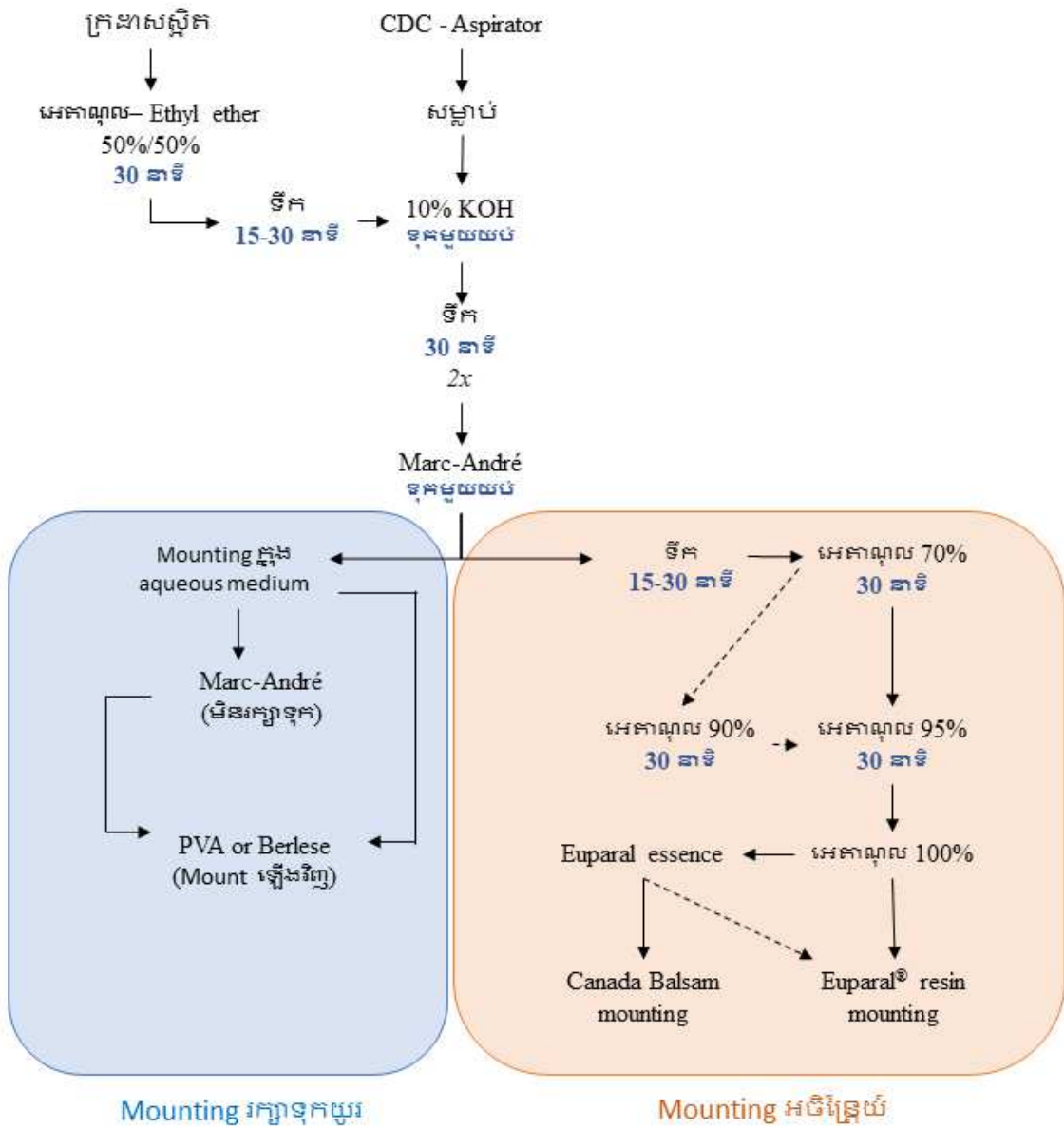


រូបទី ៦: ដំណើរការវិភាគ Phlebotomine សម្រាប់កម្មវិធីជីវវិទ្យា molecular biology ប្រូតេអូមិច និង/ឬ វិសសាស្ត្រ។

5. ការរៀបចំសំណាកសម្រាប់ការសិក្សាលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ

ផ្នែកនេះពិពណ៌នាគោលការណ៍រៀបចំសំណាក Phlebotomine សម្រាប់ mounting ដើម្បីការសិក្សាលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ និងការបំបែកសម្រាប់ការអនុវត្តផ្សេងៗ។ ដំណើរការវិភាគរួមមានជំហានបន្តបន្ទាប់នៃការបើកចេញ និងបំពេញសារធាតុរាវដោយប្រើ Pasteur pipettes ដែលភ្ជាប់ជាមួយ rubber bulbs។ ផ្តល់អនុសាសន៍ប្រើកញ្ចក់បាតមូល ព្រោះកញ្ចក់មិនមានប្រតិកម្មជាមួយវេសដង។ ដើម្បីជៀសវាងការរលាយវេសដងត្រូវបិទគម្របនិងកុំបំពេញលើសកម្រិត ដើម្បីជៀសវាងការហូរ និងការធ្លាក់ចូលនៃធូលីលើសំណាក។ ទោះយ៉ាងណាក៏ ការយល់ដឹងអំពីវិធីសាស្ត្រនេះមានសារៈសំខាន់

ព្រោះវាអនុញ្ញាតកែសម្រួលនីតិវិធីឱ្យសមស្របតាមប្រភេទសំណាកជាក់លាក់នៅពេលចាំបាច់។ ការប្រតិបត្តិសំណាកពាក់ព័ន្ធនឹងជំហានបញ្ចេញ និងបំពេញសារធាតុជាបន្តបន្ទាប់ ដោយប្រើបំពង់ទឹក Pasteur ដែលបំពាក់ដោយប៊ូលកៅស៊ូទន់អាចបត់បែនបាន។ ក្នុងប្រើបំពង់ទឹកកែវបាតមូល ព្រោះវាជួយឱ្យដំណើរការវិភាគទាំងនេះប្រព្រឹត្តទៅដោយស្រួល។ កែវមានលក្ខណៈអិនឌើន (inert) ចំពោះវេសដងទាំងអស់។ ដើម្បីទប់ស្កាត់ការអស់វេសដងដោយការហើរចេញ ត្រូវបិទគម្របបំពង់ទឹកឱ្យបានជិត ហើយមិនក្តាប់ពេញលើសកម្រិត ដែលអាចបណ្តាលឱ្យហូរចេញនៅពេលបិទ ឬបើក និងដើម្បីការពារធូលីធ្លាក់លើសំណាក។ សារធាតុគីមីដែលត្រូវការសម្រាប់ការសម្អាត (clearing) និងដំណើរការវិភាគសំណាក បង្ហាញក្នុងតារាងទី 2។



រូបទី 7: វិធីសាស្ត្របុរាណសម្រាប់ដំណើរការវិភាគ Phlebotomine។

**តារាងទី ២:** សមាសភាពនៃសារធាតុប្រតិកម្មដែលបានប្រើ

ឈ្មោះសារធាតុ	សមាសភាព
ប៉ូតាស្យូមអ៊ីដ្រូស៊ីត ១០%	ប៉ូតាស្យូមអ៊ីដ្រូស៊ីត ១០ ក្រាម ទឹកបិក(qs) ១០០ មល.
ហ្វូលស៊ីនអាស៊ីត ១ក្នុងទឹកចម្រោះ %	ហ្វូលស៊ីនអាស៊ីត (ម្សៅក្រាម ១ ( ទឹកបិក៩៩ មល. ទឹកបិក៥០ មល.
ឧបករណ៍ផ្គុំសម្រាប់mounting ក្លរ៉ាល់ហ្គីម (Hoyer medium)	ក្លរ៉ាល់អ៊ីដ្រូស៊ីត ២០០ ក្រាម អញ្ចាញអាវ៉ាប៊ីក ៥០ ក្រាម ក្លីសេរីន ២០ ម.ល.
សូលុយស្យុង Marc-André ពណ៌ដោយហ្វូលស៊ីនអាស៊ីត	សូលុយស្យុង Marc-André ១០ មល. ហ្វូលស៊ីន ១ ៥០ % $\mu$ L ក្លរ៉ាល់អ៊ីដ្រូស៊ីត ៤០ ក្រាម
សូលុយស្យុង Marc-André	អាស៊ីតអាសេទិកកក ៣០ ម.ល. ទឹកបិក៣០ ម.ល.
ឧបករណ៍ផ្គុំ Enecé	កូឡូហ្វូនស (colophony) សុទ្ធពណ៌ស ២២ ក្រាម អញ្ចាញកូដាល់ )copal gum) រលាយក្នុងអាវ៉ាប៊ីក ១២ ក្រាម អេតាណុលដាច់ខាត ២០ ម.ល. កាហ្សូរ ១០ ក្រាម
	អារម្មណ៍ទីពែនទីន )turpentine essence) ១០ មល. អ៊ីកាលីបតូល ២៦ ម.ល.

**5.1. ការធ្វើឲ្យថ្លា (Clearing)**

មុនពេលរៀបចំសំណាក Phlebotomine សម្រាប់ mounting អចិន្ត្រៃយ៍ ត្រូវធ្វើឲ្យសំណាកថ្លាដោយវិធីម៉ាស៊ីនស្យុង (maceration) ប្រើវិធីសាស្ត្រ និងសារធាតុធ្វើឲ្យថ្លា (ឧ. សូលុយស្យុងអាស៊ីតអាសេទិក 10% ឬ សូលុយស្យុង Marc-André ដែលមាន chloral hydrate

ដែលជាសារធាតុគីមីមានការគ្រប់គ្រងក្នុងប្រទេសជាច្រើន) ដើម្បីធ្វើឲ្យសំណាកក្លាយជាថ្លា។ ដំណើរការធ្វើឲ្យថ្លានេះគឺដកយកជាលិកា ឆ្កាញ់ សារធាតុបញ្ចេញ និងក្រមួន បង្កើនភាពថ្លា (translucent) និងសម្រួលការពិនិត្យរចនាសម្ព័ន្ធ exoskeleton (ឧ. កន្លែងភ្ជាប់សែតា), លក្ខណៈផ្ទៃ (ឧ. ពណ៌) និងរចនាសម្ព័ន្ធខាងក្នុងដែលអាចមើលឃើញតាម tegument (ឧ. ថង់ផ្គុំទឹកកាមញី (spermathecae))។

ដំណើរការវិភាគធ្វើឲ្យថ្លាពីរដំណាក់កាល ត្រូវប្រើសារជាតិបាស់ខ្លាំង (ឧ. potassium hydroxide) បន្ទាប់ដោយអាស៊ីតខ្សោយ (ឧ. អាស៊ីតអាសេទិក ក្នុងសូលុយស្យុង Marc-André) មានប្រតិកម្មមីជីវខុសៗគ្នា [74]។ សារជាតិបាស់ខ្លាំងអាចបំបែកជាលីកាន់ (ប្រូតេអ៊ីន ខ្លាញ់ សាច់ដុំ) តាមរយៈសាបូនីកាស្យុង (saponification) និងការបំផ្លាញរចនាសម្ព័ន្ធប្រូតេអ៊ីន ដោយរក្សាទុកស្រទាប់គីទីន (chitin) របស់ exoskeleton ឲ្យនៅស្ថិតស្ថេរ។ អាស៊ីតខ្សោយបន្ទាប់មកធ្វើអព្យាក្រឹកកម្មសារជាតិបាស់ ដែលនៅសល់ និងបំបាក់ពណ៌គីទីនដើម្បីបង្កើនភាពថ្លា [74]។ ការលាងសំណាកពីរដងក្នុងទឹកបិក15 នាទីក៏អាចគ្រប់គ្រាន់សម្រាប់ធ្វើអព្យាក្រឹកកម្មផងដែរ។ ការប្រតិបត្តិជាបន្តបន្ទាប់នេះធានាការយកចេញជាលីកា ប្រកបដោយប្រសិទ្ធភាព និងរក្សាភាពសុចរិតនៃសំណាកសម្រាប់ពិនិត្យមីក្រូទស្សន៍

**5.1.2. ការធ្វើឲ្យថ្លាជាមួយ ឬគ្មានការបំបាក់ពណ៌**

បន្ទាប់ពីដំណាក់កាលធ្វើឲ្យថ្លា សំណាកត្រូវបានអនុវត្តន៍ការចាប់បាច់ពន្លឺបានល្អ (lightening treatment) ដែលជាការប្រមូលបញ្ចូលអាស៊ីតអាសេទិក និង chloral hydrate (ឧ. សូលុយស្យុង Marc-André)។ បន្ទាប់ពីធ្វើឲ្យថ្លា សំណាកត្រូវតែលាងឲ្យស្អាតពេញលេញក្នុង water bath យ៉ាងតិចពីរដងដោយរយៈពេល 20 នាទីក្នុងមួយដង ដើម្បីយកចេញសារធាតុគីមីសល់នៅក្នុងសំណាក។ សូលុយស្យុង Marc-André គឺជាសារធាតុធ្វើឲ្យថ្លាដែលពេញនិយមសម្រាប់រៀបចំសំណាក sand fly ។ ប្រសិទ្ធភាពរបស់វាគឺងាយស្រួលក្នុងដំណើរការវិភាគធ្វើឲ្យ ថ្លា និងកាត់បន្ថយការខូចខាតដល់ទម្រង់ទន់ជ្រាយ (fragile structures) ដូចជាស្លាប និងអង់តែន។

សូលុយស្យុងនេះត្រូវរៀបចំថ្មី ឬទុកក្នុងដបដែលបិទជិត ដើម្បីការពារការហើរ ឬខូចខាត។ ការប្រើប្រាស់សូលុយស្យុង Marc-André មានប្រយោជន៍ច្រើនពេលបញ្ចូលជាមួយបច្ចេកទេសធ្វើ អោយថ្លា (brightening) ឬបំបាក់ពណ៌ពណ៌ (staining) ដើម្បីពង្រីកព័ត៌មានរាងកាយមួយចំនួន។ ព័ត៌មានលម្អិតអំពីរចនាសម្ព័ន្ធ និងការត្រៀមផ្តល់នៅក្នុង Appendix 2។ សម្រាប់សំណាកមានភាពថ្លាខ្លាំង (highly translucent) ឬការបំបាក់ពណ៌ពណ៌អាចជារឿងចាំបាច់ ដើម្បីបង្កើនភាពមើលឃើញ មុនពេលដាក់ស្លាយ។ មានសារធាតុបំបាក់ពណ៌ពណ៌ជាច្រើនដែលផ្តោតទៅលើ ធាតុគីមីជាក់លាក់នៃអង្គភាព។ វាជាការសំខាន់ក្នុងការជ្រើសរើសពណ៌ដែលត្រូវគ្នាសមស្រប ទៅនឹងសំណាក និងថ្នាលដាក់ឡាមដែលបានជ្រើសរើស។ វិធីសាស្ត្រមូលដ្ឋាននេះអាចបំបែកសារធាតុប្រើការ

។ ផ្តល់អនុសាសន៍ឲ្យលាងពីរដងក្នុងទឹកបិក20 នាទី មុនបន្តដំណាក់កាលបន្ទាប់។

**5.1.1. ការបំបែកជាលីកាន់ (Soft tissue lysis) (រូបទី 8)**

Sodium hydroxide (NaOH) ឬ potassium hydroxide (KOH) គឺជាសារធាតុម៉ាស៊ីវេស្យុងដែលប្រើជាទូទៅ ដោយកំណត់កំហាប់ និងរយៈពេលទៅតាមទំហំ និងភាពជុយស្រួយរបស់សំណាក។ វិធីសាស្ត្រស្តង់ដារមានប្រសិទ្ធភាពខ្ពស់គឺ ជ្រលកសំណាកក្នុងសូលុយស្យុងកំហាប់ខ្ពស់ (KOH ឬ NaOH 10%) ពេញមួយយប់។ អាចបង្កើនកំហាប់ (ឧ. KOH 20% រយៈពេល 6 ម៉ោង) ឬកម្ដៅនៅ 37°C ដើម្បីកាត់បន្ថយរយៈពេលផ្ទៃ។

ដូចជាការបញ្ចូល 0.1% acid fuchsin ទៅក្នុងសូលុយស្យុង Marc-André សម្រាប់បំបាក់ពណ៌ពណ៌។ បន្ថែមពីនេះ សំណាកដែលរក្សាក្នុងសូលុយស្យុងទឹក (aqueous solutions) និងគ្រោងទុកសម្រាប់ដាក់ឡាមរួមជាមួយទ្រទ្រង់ Resin ត្រូវការការអស់ទឹក (dehydration, មើល ផ្នែក 5.2) ព្រោះថ្នាលដាក់ស្លាយ Resin ធម្មជាតិ និងសំយោគចំរូងភាគច្រើនមិនសមស្របជាមួយទឹក។

New (1974) បានកំណត់សម្គាល់ថា សារធាតុបំបាក់ពណ៌មួយចំនួនអាចខូចខាតក្នុងថ្នាលដាក់ ឡាមខ្លះៗ [53]។ ឧទាហរណ៍ acid fuchsin ដែលត្រូវបានប្រើជាទូទៅជាមួយ Canada balsam ក៏អាចត្រូវបានដាក់ក្នុង Euparal® ផងដែរ។ ទោះយ៉ាងណា សំណាកដែលបានបំបាក់ពណ៌ acid fuchsin គឺងាយបាក់ពណ៌ (fading) ជាពិសេសនៅពេលមានសំណល់ប្រេងក្លូវ (clove oil) ដែលបានប្រើជារូបមន្ត clearing ចុងក្រោយ។

**5.2. ការដកជាតិទឹក (Dehydration)**

ការដកជាតិទឹកត្រូវអនុវត្តដោយផ្ទេរសំណាកតាមលំដាប់ជំហាននៃសូលុយស្យុងអេតាណុលដែលមានកំហាប់បន្តបន្ទាប់៖ 50%, 70%, 80%, 90% ឬ 95% ហើយបញ្ចប់ដោយ 100% ដោយរាល់ water bath ត្រូវចំណាយពេលយ៉ាងហោចណាស់ ២០ នាទី។ ដោយសារអេតាណុលមានលក្ខណៈហ្មត់ឆាប់ ដបត្រូវបិទជិតក្នុងអំឡុងដំណើរការវិភាគ។ បន្ទាប់ពីសំណាកត្រូវបានដកជាតិទឹកពេញលេញ អាចផ្អាកដំណើរការវិភាគរយៈពេលពីរថ្ងៃក្នុង Euparal® essence ដែលត្រូវបានណែនាំឲ្យប្រើជំនួសប្រេង clove oil។ Beech creosote ដែលធ្លាប់ត្រូវបានប្រើយ៉ាងទូលំទូលាយសម្រាប់កោលបំណ

ឯនេះ បច្ចុប្បន្នត្រូវបានហាមឃាត់ទាំងស្រុងដោយសារតុល្យភាព ពុលខ្ពស់។ ដំណើរការវិភាគដកជាតិទឹកត្រូវបានធានាថា សារធាតុរាវនៅក្នុងសំណាកមានភាពសមស្របគ្នាជាមួយ ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដើម្បីបង្ការ ភាពស្រអាប់ (opacity) ការរលំដោយសម្ពាធអុស្សីស៊ីស (osmotic collapse) ឬការប្រែប្រួលរាង (distortion) ដែលអាចធ្វើឱ្យសំណាកមិនសមស្របសម្រាប់ការសិក្សាវិនិ ច្ច័យ taxonomic។

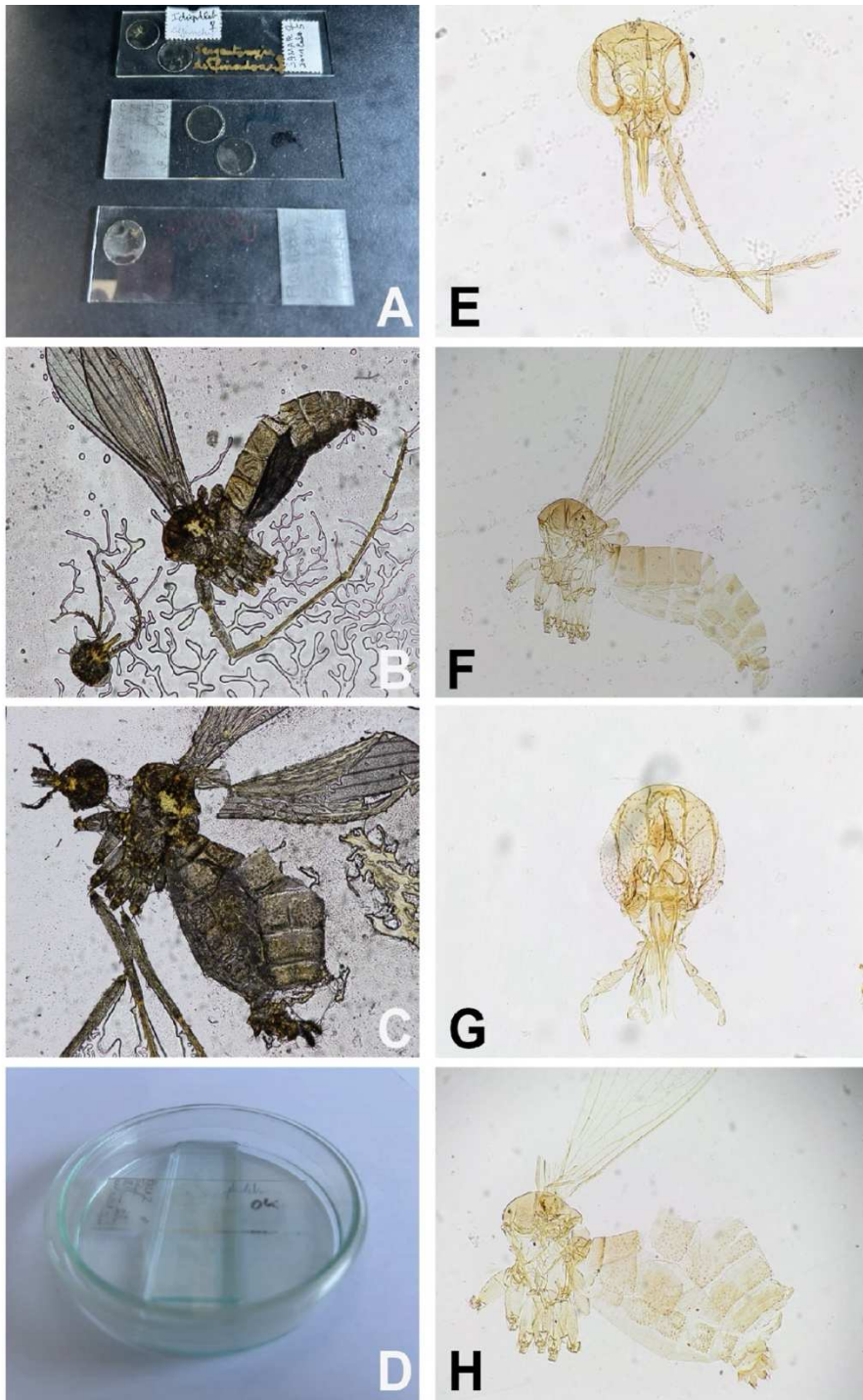
សម្រាប់ការសិក្សាចុះបញ្ជី (inventory studies) ឬការស្វែងមតិរោគវិទ្យា (epidemiological surveys) ដែលមិនចាំបាច់រក្សាទុករយៈពេលវែង ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមបណ្តោះអាសន្ន ឬពាក់កណ្តាលអចិន្ត្រៃយ៍អាចគ្រប់គ្រាន់។

### 5.3. ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម (Mounting media)

#### 5.3.1. ការជ្រើសរើស និងការអនុវត្តសម្រាប់ការរៀបចំសំណាក

ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមគួរតែមាន សន្ទស្សន៍បាក់បែក (refractive index) ជិតស្មើនឹងកញ្ចក់ ដែលប្រហាក់ប្រហែល 1.5។ វាត្រូវតែគ្មានពណ៌ ស្អាតថ្លា និងរក្សាភាពថ្លាឥតខ្ចោះបន្ទាប់ពីសម្អាតក្នុងរយៈពេលវែង ។ វាត្រូវតែធូលីជាមួយសារធាតុពណ៌ (stains) ដែលបានប្រើ និងអាចជ្រៀមចូល និងចែកចាយទៅក្នុងជាលិកាទាំងអស់នៃសំណាក។ វាមិនគួរស្លុតលឿនពេក ឬបង្កើតស្រទាប់ពពក (haze) ក្នុងអំឡុង Mountឡើយ ហើយមិនគួររុញតូចបន្ទាប់ពី Mount។

ការជ្រើសរើសថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ ឡាមសមស្របជាកត្តាមូលដ្ឋានសំខាន់ក្នុងការរៀបចំសំ ណាក ព្រោះមិនមានសារធាតុតែមួយណាដែលសមស្របសម្រាប់ គោលបំណងទាំងអស់ឡើយ។ ការជ្រើសរើសគួរតែធ្វើដោយធ្វើតុល្យភាពកត្តាសំខាន់ៗដូ ចខាងក្រោម៖ លក្ខណៈអុបទិក) Optical properties)៖ សន្ទស្សន៍បាក់បែកនៃថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើក ញ្ចក់ឡាមផ្តល់ភាពផ្ទុយ និងការបាក់បែកគ្រប់គ្រាន់សម្រាប់លក្ខណៈរចនាសម្ព័ន្ធអាណតូមីសំខាន់ៗដែលត្រូវប្រើក្នុងការកំណត់អត្តសញ្ញាណ (taxonomic identification) ឬការពិពណ៌នារូបសាស្ត្រ(morphological description) ដូចជា ថង់ផ្កកទឹកកាមញី) spermathecae), ascoids, Newstead sensilla, vertical cibarial teeth និង pharyngeal teeth។ ភាពអាចមើលឃើញនៃរចនាសម្ព័ន្ធទាំងនេះពឹងផ្អែកដោយផ្ទាល់លើលក្ខណៈអុបទិកនៃថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម។ ការរក្សាទុក(Preservation)៖ សម្រាប់ប្រភេទសំណាក(type specimens) ឬសម្ភារៈដែលមានបំណងរក្សាទុកក្នុងសមាគមអភិរក្សអចិន្ត្រៃយ៍ ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមត្រូវផ្តល់ស្ថិរភាព និងភាពធន់យូរអង្វែង។ ផ្ទុយទៅវិញ



**រូបភាព ៨:** ការកំឡើងស្វាយឡើងវិញ៖ A: ស្វាយខូច និងស្លឹក កំឡើងក្នុង Hoyer B: មើលក្រោមកាំរស្មីម៉ែក្រូស្កូប នៃសំខាន់ល្អិតស្លឹក C: មើលក្រោមកាំរស្មីម៉ែក្រូស្កូប នៃសំខាន់ល្អិតខូចមួយផ្សេងទៀត D: បន្ទះសើមដែលមានស្វាយស្លឹក E: ក្បាល និង F: រាងកាយនៃសំខាន់ B បន្ទាប់ពីកំឡើងឡើងវិញក្នុង Euparal® G: ក្បាល និង H: រាងកាយនៃសំខាន់ C ខូច បន្ទាប់ពីកំឡើងឡើងវិញក្នុង Euparal®

5.3.2.

តម្រូវការសម្រាប់ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម

អ្នកជំនាញជាច្រើនតែងតែអភិវឌ្ឍបច្ចេកទេស Mount ដែលបានប្តូរតាមតម្រូវការ និងមានស្ថិតស្ថេរ ដើម្បីធានាថាជាមួយគោលបំណងស្រាវជ្រាវជាក់លាក់។ ទោះជាយ៉ាងណា វិធីសាស្ត្រទាំងនេះជាញឹកញាប់មិនបានគិតគូរពីគុណភាពអភិរក្សរយៈពេលវែង) archival quality) ភាពស្របគ្នា (compatibility) ការស្តង់ដារភាព) standardization) ឬភាពងាយស្រួលក្នុងការដោះស្រាយ និងការអភិរក្សយូរអង្វែង។ កង្វះស្តង់ដារភាពនេះបង្កការលំបាកក្នុងការបញ្ជូលសមាសធាតុបរិច្ចាគទៅក្នុងសមាគម និងការគ្រប់គ្រងអភិរក្សរយៈពេលវែង។ កម្មវិធីវិទ្យាសាស្ត្រមានតម្រូវការពិសេសខុសគ្នាសម្រាប់ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម។ អ្នកអាណតូមីសាស្ត្រ (taxonomists) ជាញឹកញាប់ Mount សំណាកទាំងមូលនិងចូលចិត្តសារធាតុដែលអាចបង្កើតការរំលាយជាលិកាខាងក្នុង) gentle maceration of inner organs) ដើម្បីបង្កើនភាពច្បាស់នៃរចនាសម្ព័ន្ធ cuticular។ សន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺ) refractive index) គួរមានភាពខុសគ្នាគ្រប់គ្រាន់ពីសំណាក និងកញ្ចក់ឡាម ដើម្បីបង្កើនភាពច្បាស់អុបទិកអតិបរមា។

ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមពាណិជ្ជកម្មភាគច្រើនត្រូវបានរៀបចំឲ្យមានសន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺជិតស្មើនឹងកញ្ចក់ ដើម្បីកាត់បន្ថយការបាច់ពន្លឺ និងការបែកខ្ញែកពន្លឺតាមប្រព័ន្ធកញ្ចក់ឡាម-ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម-ឡាមែល។ ទោះយ៉ាងណា ក្នុងមីក្រូទស្សន៍ពិប្រាំង) brightfield ភាពងាយធម្មជាតិនៃសំណាកដែលមិនបានបំពាក់ពណ៌ពណ៌) unstained specimen) អាចត្រូវបានកែប្រែដោយជ្រើសរើសថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលមានសន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺខុសបន្តិចពីសំណាកដោយវិធីនេះអាចបង្កើនភាពអាចមើលឃើញលើផ្ទៃខាងក្រោយ។

5.3.3. ប្រភេទថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម (តារាង ៣ និង ៤)

មីក្រូទស្សន៍ពិប្រាំងត្រូវការសន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺ) Refractive Index; RI) នៃថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម ដើម្បីកំណត់ពីរបៀបដែលពន្លឺបត់ឆ្លងកាត់កញ្ចក់ឡាម

ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម និងសំណាក។ នៅពេល RI មានភាពស្របគ្នាជិតស្មើនឹងកញ្ចក់ឡាមែល (~1.515) ពន្លឺនឹងឆ្លងកាត់យ៉ាងស្មើភាព កាត់បន្ថយការបែកខ្ញែក និងការប្រែប្រួលអុបទិក បណ្តាលឲ្យមានភាពច្បាស់ល្អប្រសើរ និងការមើលឃើញលម្អិតរចនាសម្ព័ន្ធកូចៗបានប្រសើរ។ ផ្ទុយទៅវិញ ការមិនស្របគ្នានៃ RI អាចបង្កភាពព្រិល (blurring) រង្វង halo ឬបំបាក់លក្ខណៈដែលមិនបានបំពាក់ពណ៌ពណ៌។ ដូច្នេះ ការជ្រើសរើសថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមសមស្របមានសារៈសំខាន់ដើម្បីបង្កើនភាពងាយស្រួលភាពច្បាស់ និងគុណភាពរូបភាពសរុបសម្រាប់សំណាកណាមួយ ព្រោះសារធាតុនីមួយៗមាន RI ខុសគ្នា។

សន្ទស្សន៍បាច់ពន្លឺនៃថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមានតម្លៃពេញលេញយ៉ាងសំខាន់លើការមើលឃើញរចនាសម្ព័ន្ធលម្អិតនៅពេលរៀបចំ sand flies សម្រាប់ Mount លើឡាមកញ្ចក់។ លក្ខណៈស្រាល និងមានការស្តើងស្រកម្តៅ) lightly sclerotized) របស់ sand flies រួមមាន cibarial armature, ថង់ផ្គុកទឹកកាមញី (spermathecae), ផ្នែកអង្កែត) antennal segments) និងសរសៃស្បា) wing venation) អាចពិបាកមើលឃើញនៅក្នុងថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលមាន RI ខ្ពស់។

ជម្រើសដែលត្រូវបានប្រើជាញឹកញាប់សម្រាប់ sand flies មាន gum-chloral media ជាថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋានទឹក និង Canada balsam និងជ័រ Enecé - Nelson Cerqueira (NC) resin ជាថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋានរំលាយក្នុងសូលវ៉ង់។ Rawlins [60] បានចាត់ថ្នាក់ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមជា ២ ប្រភេទ៖ ១ (ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមអចិន្ត្រៃយ៍) permanent media) ដែលរឹងខ្លាំងតាមពេលវេលា និងសមស្របសម្រាប់ការអភិរក្សរយៈពេលវែង; ២ (ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមពាក់កណ្តាលអចិន្ត្រៃយ៍) semi-permanent media) ដែលមិនរឹងពេញលេញ និងត្រូវបានប្រើសម្រាប់គោលបំណងបណ្តោះអាសន្ន។

ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម) mounting media) អាចមានសភាពជារូបរាវ មានមូលដ្ឋានជាគោល (gum-based) ឬជាជ័រ) resinous) ដែលរំលាយក្នុងទឹក អាណូលីន ឬសូលវ៉ង់សរីរាង្គផ្សេងៗ) ឧ. toluene, xylene) (តារាង ៣) ។ បន្ទាប់ពីអនុវត្តលើកញ្ចក់ឡាមហើយ វាត្រូវបានបិទការប៉ះពាល់ពីបរិយាកាសដោយប្រើសារធាតុ

បិទគែម) ringing media) ដែលមិនរលាយ។ ដើម្បីបែងចែកប្រភេទថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមឲ្យបានច្បាស់អាចប្រើការចាក់ថ្នាក់ដូចខាងក្រោម៖

ក .  
ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋានទឹក (Aqueous media) សារធាតុប្រភេទនេះរលាយបានងាយក្នុងទឹក ដូច្នេះសមស្របសម្រាប់ Mount បណ្តោះអាសន្ន ឬពាក់កណ្តាលអចិន្ត្រៃយ៍។ ជាទូទៅ វាងាយស្រួលក្នុងការប្រើប្រាស់ ប៉ុន្តែអាចត្រូវការការបិទគែម ដើម្បីបង្ការការប៉ះពាល់ពីសំណើមបរិយាកាស) ឧ .gum-chloral media និង polyvinyl alcohol) ជាពិសេសក្នុងតំបន់អាកាសធាតុត្រូពិចដែលមានសំណើមខ្ពស់។

ខ .  
ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលមិនធនទឹក) Limited water-tolerant media) សារធាតុប្រភេទនេះត្រូវបានប៉ះពាល់ដោយទឹកតិចជាង ប៉ុន្តែត្រូវការការពារពីសំណើមខ្ពស់។ វាផ្តល់ស្ថិរភាពរយៈពេលវែងប្រសិនបើសារធាតុរលាយក្នុងទឹក

ហើយត្រូវបានប្រើញឹកញាប់សម្រាប់ម៉ោនពាក់កណ្តាលអចិន្ត្រៃយ៍។

គ .  
ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមរលាយក្នុងអ៊ីដ្រូកាបូន) Hydrocarbon-soluble media) សារធាតុប្រភេទនេះរលាយក្នុងសូលវ៉ង់សេរីវាងដូចជា xylene ឬ toluene ឬ essenecé (enecé solvent)។ វាត្រូវបានចនាឡើងសម្រាប់ Mount អចិន្ត្រៃយ៍ និងផ្តល់ស្ថិរភាពយូរអង្វែងល្អប្រសើរ ព្រមទាំងធននឹងសំណើម និងការប្រែប្រួលគុណភាព (degradation) ដូច្នេះសមស្របសម្រាប់គោលបំណងអភិរក្សឯកសារ (archival purposes) (ឧ .neutral Canada balsam)។

ជាមួយ  
ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមរលាយក្នុងទឹកសមស្របបំផុតសម្រាប់ Mount បណ្តោះអាសន្ន ឬករណីដែលត្រូវការដកសំណាកចេញបានងាយ; សារធាតុអត់ធនទឹកកម្រិតកំណត់សមស្របសម្រាប់ Mount ពាក់កណ្តាលអចិន្ត្រៃយ៍ដែលត្រូវការភាពធនថ្នាល; ចំណែកសារធាតុរលាយក្នុងអ៊ីដ្រូកាបូនគឺជាជម្រើសអាទិភាពសម្រាប់ម៉ោនអចិន្ត្រៃយ៍ដែលមានបំណងរក្សាទុក និងរក្សាទុករយៈពេលវែង។

**តារាង ៣៖** សមាសធាតុនៃថ្នាំថ្លែងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលបានជ្រើសរើស) Composition of selected mounting media)

ឧបករណ៍ផ្គុំសម្រាប់ mounting	សារធាតុរំលាយ	សារធាតុមុនពហុអង្គធាតុ (Pre-polymer(s)) ឬ ពហុអង្គធាតុដែលអាចមាន	កំណត់សម្គាល់
ហ្វឺរី (Hoyer) = ក្លរ៉ាល់ហ្គឹម (chloral gum)	ក្លីសេរីន, ទឹក	សមាសធាតុនៃអញ្ចាញអាហ្វីប៊ីក	ភ្នាក់ងាររំលាយជាលីកា (Macerating agent)៖ ក្លរ៉ាល់អ៊ីដ្រូក
CMCP-9 (=កាបូស៊ីមេទីលសែលុយឡូសហ្គេណុល)	ទឹក (CMCP-9: ៥១-៦០%)	ប៉ូលីវីនីលអាស់កុលដែលត្រូវបានអ៊ីដ្រូលីសពេញលេញ (CMCP-9: ០-៥%)	CMC(P)-9៖ ថ្នាក់ viscosity ទាប៖ ថ្នាក់ viscosity ខ្ពស់
DMHF (ឌីមេទីលអ៊ីដង់តូអ៊ីនហ្វ័រមេអ៊ីដ)	ទឹក	N,N'-ឌីមេទីលអុលឌីមេទីលអ៊ីដង់តូអ៊ីន (ឌី-មេទីលអុល DMH) អូលីហ្គូម៉ែរដែលមានស្ថានអេធើរ/មេទីលីន បណ្តាញពហុអង្គធាតុ DMH-ហ្វ័រមេអ៊ីដដែលមានគំណភ្ជាប់ឆ្លងកាត់ (Crosslinked)	-
បាសាំកាណាដា (Canada balsam)	ស៊ីលីន (xylene); សមាសធាតុដាយហ្គុតខ្លះនៃបាសាំ (Δ <sup>3</sup> -ការីន, អាស៊ីតលេវូភីម៉ារិក, លីម៉ូណែន, មៀរស៊ីន, អាស៊ីតប៉ាលូស្ត្រិក, β-ហ្វេឡង់ទ្រីន, α-ភីណែន, β-ភីណែន)	បាសាំ (អាប៊ីណុល, អាស៊ីតអាប៊ីអ៊ីទឹក, អាស៊ីតអ៊ីសូភីម៉ារិក, អាស៊ីតសាន់ដាវ៉ាភីម៉ារិក)	អញ្ជាត្រីតកម្ម (neutralization)៖ ប៉ូតាស្យូមកាបូណាត; ជំរើប្រភេទដើមពោធិ Abies balsamea (លីបេ, ១៧៥៨)
អឺប៉ារ៉ាល់® (Euparal®)	អ៊ីកាលីបតូល, ប៉ារ៉ាល់ដេអ៊ីដ; សមាសធាតុដាយហ្គុតខ្លះនៃអញ្ចាញសាន់ដាវ៉ាក (លីម៉ូណែន, α-ភីណែន, β-ភីណែន)	សមាសធាតុនៃអញ្ចាញសាន់ដាវ៉ាក (អាស៊ីតកូមូនីក, ម៉ាណុល, អាស៊ីតប៉ូលីកូមូនីក, អាស៊ីតសាន់ដាវ៉ាកភីម៉ារិក, ១២-អាសេតុកស៊ី-សាន់ដាវ៉ាកភីម៉ារិក, ស៊ីដីអុល, អាស៊ីតតូរូលីស៊ីក, តូរូលីស, តូតារ៉ុល)	ភ្នាក់ងារធ្វើឱ្យថ្លា (clearing agent)៖ មេទីលសាលីស៊ីឡេត ; ពណ៌បៃតងក្នុង Euparal®៖ អំបិលទង់ដេង (ក្របពារអាប៊ីអ៊ីទីណេត); ជំរសាន់ដាវ៉ាកពីប្រភេទដើម Tetraclinis articulata (វ៉ាល់, ១៧៩១)
អេណេសេ (Enecè)	អេទីលអាស់កុល; ជាមួយកាហ្សូរ, អ៊ីកាលីបតូល និងអារម្មណ៍ទីពោនទីន	សមាសធាតុនៃអញ្ចាញកូប៉ាល់ (copal gum) និងកូឡូហ្វូន (colophony = rosin)	-

**តារាង**

៤៖

អត្ថប្រយោជន៍

និងគុណវិបត្តិនៃថ្នាំប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលបានជ្រើសរើសទាក់ទងនឹងកញ្ចក់ឡាមមីក្រូទស្សន៍និងការសង្កេតមិនបានបោះពុម្ពផ្សាយរបស់អ្នកជំនាញផ្សេងៗ [52]។

ឈ្មោះ	គុណសម្បត្តិ	គុណវិបត្តិ
	<p>ឧបករណ៍ផ្ទុកមានភាពជាប់លាប់ខ្ពស់ អាចប្រើប្រាស់លើសពី ១៥០ ឆ្នាំ។</p> <p>អាចmountingស្លាយដោយប្រើប្រាស់ប្រេងក្លូវ (clove oil) ឬ ហ្វូណុល ជាភ្នាក់ងារmounting។</p>	<p>មានសមាសធាតុបង្កគ្រោះថ្នាក់ ត្រូវប្រុងប្រយ័ត្ន និងប្រើប្រាស់ក្រោមឧបករណ៍ស្រូបផ្សែង (hood)។</p> <p>តម្រូវឱ្យធ្វើខ្សែសង្វាក់ខ្សោះជាតិទឹក (dehydration series) ពេញលេញ ដែលចំណាយពេលច្រើន។</p> <p>ការខ្សោះជាតិទឹកជាមួយអេតាណុល និងការផ្ទេរតាមរយៈស៊ីលីន ឬ ប្រេងក្លូវ អាចធ្វើឱ្យសំណាកខ្លះផុយស្រួយ។ សារធាតុជំនួស (ដូចជា អ៊ីសូប្រូដាណុល, n-ប៊ុយតាណុល, សេឡូសូល™, ១,៤-ឌីអុកសេន, ហ៊ីស្ត្រូ, គីក្រីណេអុល) អាចកាត់បន្ថយការបាក់បែកបាន។</p>
<b>Canada balsam</b>		<p>សំណាកអាចប្រែជាខ្មៅ ប្រសិនបើជំនួស ស៊ីលីន ដោយហ្វូណុល ឬ ប្រសិនបើនៅសល់ប៉ូតាស្យូមអ៊ីដ្រូស៊ីត។ សន្ទស្សន៍ចំណាំងបែរខ្ពស់អាចបិទបាំងរចនាសម្ព័ន្ធដែលមិនបានបំពាក់ពណ៌ពណ៌។</p> <p>ការស្តុកពេញលេញអាចចំណាយពេលច្រើនឆ្នាំ ប្រសិនបើគ្មានការសម្អាតលើផ្ទៃកម្ដៅ (hot-plate drying)។ ឧបករណ៍ផ្ទុកប្រែពណ៌លឿង និងងងឹតទៅតាមពេលវេលា ជាពិសេសនៅពេលធ្វើឱ្យស្លាមជាមួយប្រេងក្លូវ។</p> <p>ស្នាមប្រឡាក់ខ្លះចុះខ្សោយ ហើយពណ៌ដែលមានបន្ទុកអ៊ីយ៉ុងវិជ្ជមាន (cationic dyes) អាចរលាត់ ប្រសិនបើឧបករណ៍ផ្ទុកមានជាតិអាស៊ីត (ដែលអាចកើតឡើងដោយឯកឯងតាមពេលវេលា)។</p>
<b>DMHF (ឌីមេទីលអ៊ីដង់តូអ៊ីនហ្វូមរ៉េអ៊ីដ)</b>	<p>គម្លាភាពខ្ពស់ សន្ទស្សន៍ចំណាំងបែរល្អ អាចមើលឃើញរចនាសម្ព័ន្ធបានយ៉ាងប្រសើរ</p> <p>ការត្រៀមល្អមានស្ថេរភាពគួរសម ឆាប់គ្នាជាមួយបច្ចេកទេសបំពាក់ពណ៌ពណ៌ជាច្រើន</p> <p>ការពារសំណាកបានល្អ ភាពស្ថិតជាប់ល្អរវាងស្លាយ និងគម្របកញ្ចក់</p> <p>ឧបករណ៍ផ្ទុកជាប់លាប់ អាចប្រើបានលើសពី ៥០ ឆ្នាំ។</p>	<p>អាចប្រែពណ៌លឿងតាមពេលវេលា អាចប្រែប្រួលពណ៌ស្នាមប្រឡាក់ខ្លះ</p> <p>មិនស័ក្តិសមសម្រាប់ពណ៌ដែលងាយនឹងហ្វូមរ៉េអ៊ីដ</p> <p>អាចមានពពុះខ្យល់ ពេលស្តុកយឺត</p> <p>ឧបករណ៍ផ្ទុកងាយនឹងសំណើម</p> <p>ការmountingពិបាកក្នុងការធ្វើឱ្យត្រឡប់ដើមវិញ ហ្វូមរ៉េអ៊ីដ មានជាតិពុល, ឆាប់ខឹង, បង្កមហារីក</p>
<b>Euparal</b>	<p>អាចmountingដោយផ្ទាល់ពីអេតាណុល ៨០% (តាមអនុសាសន៍ក្រុមហ៊ុនផលិត)។</p> <p>មិនបិទបាំងរចនាសម្ព័ន្ធដែលមិនបានបំពាក់ពណ៌ពណ៌ និងមិនប្រែពណ៌លឿង ឬ ផុយតាមពេលវេលា។</p>	<p>មានសមាសធាតុបង្កគ្រោះថ្នាក់ ត្រូវប្រុងប្រយ័ត្ន និងប្រើប្រាស់ក្រោមឧបករណ៍ស្រូបផ្សែង។</p> <p>ការខ្សោះជាតិទឹកជាមួយអេតាណុល និងការផ្ទេរតាមរយៈអ៊ីប៉ារ៉ាល់ អេស្សិន (Euparal Essence) អាចធ្វើឱ្យសំណាកខ្លះផុយស្រួយ ប៉ុន្តែការប្រើ អ៊ីសូប្រូដាណុល អាចកាត់បន្ថយបញ្ហានេះបាន។</p>

មានសន្ទស្សន៍ចំណាំដំបែរសមស្របជាង បាស់កាណាដា សម្រាប់ពួក Diptera (សត្វរុយ)។

ដំណើរការល្អសម្រាប់សំណាកក្រាស់ ដោយសារការរុញតូចតិចតូចបំផុត និងការស្លុតគ្មានពពុះ។

នៅតែរលាយក្នុងអេតាណុល ៩៥% ដែលអនុញ្ញាតឱ្យ mounting ឡើងវិញ សូម្បីតែបន្ទាប់ពីច្រើនឆ្នាំក៏ដោយ។

អាច mounting សំណាកដែលនៅរស់ ឬ ដោយផ្ទាល់ពីទឹក អេតាណុល ឬ ហ្វមរដេអ៊ីដ។

ការរំលាយជាលិកា (maceration) ផ្តល់នូវគុណភាពផ្ទៃខាងក្រៅ (cuticle) ល្អគុណខ្លះៗ។

មានសន្ទស្សន៍ចំណាំដំបែរអំណោយផល ហើយអាចបង្កើនកម្រិតពណ៌ជាមួយ ការបំពាក់ពណ៌ពណ៌អ៊ីយ៉ូត។

**Hoyer fluid**

អាស៊ីតអាសេទិកក្នុងរូបមន្តអាចពង្រីក សរីរាង្គនៃ arthropods (arthropod appendages)។

សំណាកខ្លះអាចនៅមានស្តេរោភពរហូត ដល់ ៤០-៦០ ឆ្នាំ។

រលាយក្នុងទឹក ងាយស្រួលក្នុងការ mounting ឡើងវិញ។

អាច mounting សំណាកដោយផ្ទាល់ពីឧបករណ៍ផ្ទុកដូចជា ទឹក អេតាណុល ក្តីសេរីន ឬ

**CMCP-9 (= កាបូស៊ីមេទីលសែ លុយឡូសហ្វេណុល)**

សូលុយស្យុងដែលមានហ្វមរដេអ៊ីដ ហើយសរីរាង្គខាងក្នុងរបស់វាអាចត្រូវបាន គេរំលាយជាលិកា (macerated) នៅពេលចាំបាច់ ដើម្បីជួយសម្រួលដល់ការពិនិត្យទៅ ឬការត្រៀមលក្ខណៈ។

ឧបករណ៍ផ្ទុកជាប់លាប់ អាចប្រើបានលើសពី ៣០ ឆ្នាំ។

ឆបត្តាជាមួយសារធាតុរំលាយជាច្រើន សម្រាប់ mounting រួមមាន អាសេតូន, បេនហ្ស៊ីន, ក្លរូហ្វម, ឌីអុកសាន, អេធើរ, អ៊ីសូប្រូដាណុល, មេទីលបេនហ្ស៊ីអេត, គីក៍ណេអុល, តូលូអ៊ីន, និង ស៊ីលីន។

**Eukitt™**

ស្លុតលឿន និងមាន pH អាស៊ីតបន្តិច។ មិនងងឹតក្នុងឱ្យកកសម្គាល់តាមពេលវេលា។

សំណាករួមជាតិដែលឆ្ងាញ់អាចបាក់បែក លើកលែងតែបន្ថែមឧបករណ៍ផ្ទុកបន្តិចម្តងៗ ដែលចំណាយពេលច្រើន។

ប្រហោង (cavities) និងគ្រីស្តាល់អាចបង្កើតបានក្នុងរយៈពេលតិចជាង ១០ ឆ្នាំ។

ការរំលាយជាលិកាអាចហួសកម្រិត អាស្រ័យលើកំហាប់ក្លរ៉ូរ៉ាមីន និងពេលវេលាប៉ះពាល់។

សមាសធាតុនៃឧបករណ៍ផ្ទុកអាចបំបែកចេញពីគ្នា ហើយគ្រាប់ពូជអាចលេចឡើងក្នុងរយៈពេលប៉ុន្មានខែ ឬច្រើនឆ្នាំ។

មានរបាយការណ៍អំពីការប្រែខ្មៅនៃឧបករណ៍ផ្ទុក។

ឧបករណ៍ផ្ទុកនេះអាចបង្កើតគ្រីស្តាល់ និងងងឹតទៅតាមពេលវេលា ហើយជួនកាលអាចរំលាយជាលិកាសំណាកច្រើនជាងការចង់បាន។ លើកលែងតែស្លាយត្រូវបានព័ទ្ធជុំវិញ (ringed) ដោយប្រុងប្រយ័ត្ន សំណាកក្រាស់ៗនឹងមិនល្អជាមួយវាទេ ព្រោះវាអាចរុញ និងបង្កើតកម្លាតនៅជុំវិញតែម្តងរបស់កម្របកញ្ចក់។ វាមិនស័ក្តិសមសម្រាប់សំណាកដែលបានបំពាក់ពណ៌ពណ៌ ឬ វត្ថុធាតុដែលមានជាតិកាល់ស្យូម ហើយពេលវេលាស្លុតរបស់វាមិនជាង CMC។

មានសមាសធាតុបង្កគ្រោះថ្នាក់ ត្រូវប្រុងប្រយ័ត្ន និងប្រើប្រាស់ក្រោមឧបករណ៍ស្រូបផ្សែង។

តម្រូវឱ្យធ្វើខ្សែសង្វាក់ខ្សោះជាតិទឹក ពេញលេញ ដែលចំណាយពេលច្រើន។

មិនល្អសម្រាប់សំណាកក្រាស់ ដោយសារការរុញតូច និងការបង្កើតពពុះឧស្ម័ន។

កម្របកញ្ចក់អាចរលាយចេញតាមពេលវេលា លើកលែងតែកញ្ចក់ត្រូវបានសម្អាតឱ្យបានល្អ និងបិទជិត។

ស័ក្តិសមសម្រាប់ពណ៌ផ្សេងៗ (ឧទា. ហ្វូលស៊ីន, ហេម៉ាតូស៊ីន, មេទីលបៃតង, មេទីលវ័យឡែក, មេទីលខៀវ)។

អាចបង្ហាញពីការក្លាយជាពហុអង្គធាតុ (polymerization) មិនពេញលេញនៅជុំវិញសរសៃកូឡាដែន។

អាច mounting សំណាកឡើងវិញបន្ទាប់ពីច្រើនឆ្នាំ ដោយត្រាំក្នុង ស៊ីលីន រយៈពេលយូរ។

កម្រិតខ្ពស់ខ្សែសង្វាក់ខ្សោះជាតិទឹក ពេញលេញ ដែលចំណាយពេលច្រើន។

ឧបករណ៍ផ្ទុកជាប់លាប់ខ្ពស់ យ៉ាងហោចណាស់ ៥០ ឆ្នាំ។

ការខ្សោះជាតិទឹកជាមួយអេកាណូល និងការផ្ទេរតាមរយៈប្រេងក្លរូ អាចធ្វើឱ្យសំណាកខ្លះផុយស្រួយ។

អេណេសេ មិនងងឹតទៅតាមពេលវេលាទេ។

**Enecé**

វាអាចបត់បែនបានច្រើនជាង ដែលអនុញ្ញាតឱ្យធ្វើការកាត់សត្វល្អិតក្នុងឧបករណ៍ផ្ទុក ព្រមទាំងផ្តល់ពេលវេលាសមរម្យសម្រាប់កំណត់ទីតាំងរចនាសម្ព័ន្ធសរសៃវិទ្យា។

សត្វល្អិតនៅតែបន្តក្លាយជាផ្លា (clarified) ទោះបីយឺតយ៉ាវក៏ដោយ ដែលអាចធ្វើឱ្យពិបាកមើលឃើញរចនាសម្ព័ន្ធតូចៗ ដូចជា សរសៃញាណ (sensilla), អាស្តូអ៊ីដ (ascoids), និង រោមសាមញ្ញ (simple setae)។

កម្រិតទាប។

**5.3.4. សេចក្តីពិពណ៌នាថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមដែលបានណែនាំ) តារាង ៣ និង ៤(**

ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមសម្រាប់ការសង្កេតបណ្តោះអាសន្ន

Chloral gum = Hoyer fluid/medium/solution (RI = 1.48) Marc André fluid គឺជាថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមល្អបំផុតសម្រាប់ការសង្កេតរយៈពេលខ្លី) ពីរបីម៉ោង ហើយអាចយូរជាងនេះ ប្រសិនបើកញ្ចក់ឡាមត្រូវបានរក្សាទុកក្នុងបន្ទប់មានសំណើម (លើថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី) spermathecae) រួមទាំងការថតរូប) រូបទី ៤ (ឬក៏នូវការរក្សាទុកថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី) spermathecae) ដែលបានសង្កេតត្រូវការ Mount ឡើងវិញក្នុងថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋានទឹក ដែលអនុញ្ញាតឱ្យរក្សាទុករយៈពេលថ្នាល។ ការដកជាតិទឹកសម្រាប់ Mount ឡើងវិញក្នុងជ័រ) resin) មិនមែនជាការមិនអាចធ្វើបានទេ ប៉ុន្តែមិនត្រូវបានណែនាំ) ហានិភ័យបាត់បង់សំណាក(។ Chloral gum និង Hoyer fluid ត្រូវបានចាត់ទុកថាជាសមនាម។ សារធាតុនេះត្រូវបានប្រើជាញឹកញាប់សម្រាប់សង្កេតសេរីវា អ្នកខាងក្នុងដោយសារតែភាពឆបគ្នាជាមួយទឹក ភាពសាមញ្ញ អនុវត្តលឿន និងសន្ទូស្យន់បាច់ពន្លឺ)refractive index) ដែលអនុគ្រោះដល់ការពិនិត្យរចនាសម្ព័ន្ធស្រាលៗ ដូចជា ថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae)។ ទោះជាយ៉ាងណា chloral gum មានគុណវិបត្តិសំខាន់

ប្រសិនបើមិនបានរៀបចំឱ្យបានត្រឹមត្រូវ ឬរក្សាទុកក្រោមលក្ខខណ្ឌសំណើមគ្រប់គ្រង។ បញ្ហាទាំងនេះរួមមាន ការកើតគ្រីស្តាល (crystallization) ការប្រែពណ៌) discoloration) និងការបាត់បង់ភាពខាប់ (viscosity)។ ការបិទតែម ឡាមែល មិនអាចដោះស្រាយបញ្ហាទាំងនេះបានទេ ព្រោះថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមអាចប្រែពណ៌យ៉ាងខ្លាំង) ពេលខ្លះជិតខ្មៅ (ដោយសារប្រតិកម្មជាមួយ ringing medium ជាពិសេសនៅពេលប្រើ Euparal®។ Hoyer medium ត្រូវបានចាត់ទុកថាមានលក្ខណៈអុបទិកល្អបំផុតសម្រាប់ phlebotomine sandflies ហើយត្រូវបានប្រើតាមប្រពៃណីសម្រាប់គោលបំណងនេះ។ សារធាតុនេះមានរូបមន្តជាច្រើនដែលមានទំនាក់ទំនងជិតស្និទ្ធ រួមមាន gum arabic, glycerol និង chloral hydrate។ រូបមន្តខ្លះត្រូវបានបកស្រាយ និងដកស្រង់ខុស [74]។ ទោះបីជា Hoyer ជាថ្នាលល្អសម្រាប់សង្កេតថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae) ក្នុង sand flies ក៏ដោយ វាមិនសមស្របសម្រាប់ការអភិរក្សរយៈពេលវែងទេ។ វាសមស្របសម្រាប់ការសង្កេតរយៈពេលខ្លី រួមមានការថតរូប កំនូរ ឬរូបភាពផ្សេងៗ។ ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋានទឹកសមស្របសម្រាប់ Mount បណ្តោះអាសន្ន ប៉ុន្តែមិនអាចធានាការរក្សាទុករយៈពេលវែងឡើយ។ ផ្ទុយទៅវិញ ការ Mount ដោយជ័រ) resin mounting) ផ្តល់ភាពធន់ល្អប្រសើរអាចរក្សាបានរយៈពេលជាច្រើនសតវត្សរ៍ ប៉ុន្តែអាចបំបាក់ដល់ម្នីរចនាសម្ព័ន្ធតូចៗនៃថង់ផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae) ព្រោះលក្ខណៈ refringence របស់វាជាញឹកញាប់ត្រូវបានបាត់បង់។ Hoyer medium

ប្រេះប្រាយតាមពេលវេលាដោយសារការបាក់បង់ទឹក  
 )Figure 8) បណ្តាលឲ្យកើតគ្រីស្តាល់ chloral hydrate ពណ៌ស  
 ស្រអាប់តូចៗ។ ទោះជាយ៉ាងណា  
 សំណាកអាចស្តារឡើងវិញពីកញ្ចក់ឡាមដែលមានគ្រីស្តាល់  
 ព្រោះ cuticle នៅតែស្ថិតស្ថេរផ្នែកកិមី  
 ទោះបីអាចមានការខូចខាតផ្នែកការវិភាគលក្ខណៈរូបសា  
 ស្ត្រខ្លះដោយសារការលូតលាស់គ្រីស្តាល់។  
 ក្នុងករណីខ្លះកញ្ចក់ឡាមដែលមានគ្រីស្តាល់អាចស្តារឡើងវិ  
 ញដោយបន្ថែមសំណើមក្នុងបរិយាកាសក្តៅសើម និងប្រើ  
 thymol ដើម្បីបង្ការការលូតលាស់ផ្សិត។ ជាជម្រើសផ្សេង  
 សំណាកអាចជ្រាបចេញពី gum chloral ក្នុងទឹក  
 បន្ទាប់មកដកជាតិទឹកក្នុង glacial acetic acid ហើយ  
 Mount ឡើងវិញក្នុង Canada balsam។

DMHF (dimethyl hydantoin formaldehyde) (RI = 1.48)  
 ថ្នាលប្រើក្នុងការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាមមូលដ្ឋាន  
 ទឹកនេះ] 72] មានលក្ខណៈអុបទិកល្អណាស់ ស្រដៀងនឹង  
 Berlese ហើយងាយប្រើដូច Berlese ផងដែរ។ ទោះយ៉ាងណា  
 ខុសពី Berlese វាមិនប្រែជាពណ៌ខ្មៅ  
 ឬបង្កើតគ្រីស្តាល់ឡើយ។ វាសមស្របសម្រាប់ sand flies  
 និងសមាជិកផ្សេងទៀតនៃគ្រួសារ Psychodidae។

រូបភាពទី ៨៖ ការ mounting ថ្នាលឡើងវិញ) Slide  
 remounting)  
 A: កញ្ចក់ឡាមខូចខាត និងស្លឹក  
 ដែលបាន mounting ដោយថ្នាល Hoyer B:  
 ទិដ្ឋភាពក្រោមមីក្រូទស្សន៍នៃ phlebotomine Phlebotomine  
 ដែលស្លឹក C: ទិដ្ឋភាពក្រោមមីក្រូទស្សន៍នៃ Phlebotomine  
 មួយផ្សេងទៀតដែលខូចខាត D: បន្ទប់សើម) wet  
 chamber) ដែលផ្តុកកញ្ចក់ឡាមស្លឹក E: ក្បាល និង F:  
 ខ្លួនរបស់សំណាក B បន្ទាប់ពីបាន mounting ឡើងវិញក្នុង  
 Euparal® G: ក្បាល និង H: ខ្លួនរបស់សំណាក C  
 ដែលខូចខាត បន្ទាប់ពីបាន mounting ឡើងវិញក្នុង  
 Euparal®

CMCP (camphor-mono-chlorophenol) (RI = 1.41)  
 CMCP  
 គឺជាថ្នាល mounting មានមូលដ្ឋានលើក្លីសេរីនដែលរលាយក្នុង  
 ទឹកត្រូវបានប្រើសម្រាប់បង្កើតកញ្ចក់ឡាមអចិន្ត្រៃយ៍  
 )permanent slides)  
 មានភាពស្រាប់សំណាកសេរីវាមានភាពស្រាលរឹងទ  
 ន់ រួមទាំង sand flies ផងដែរ។  
 អត្ថប្រយោជន៍នៃថ្នាលនេះគឺអាច mounting សំណាកដោយ  
 ថ្នាលពីទឹក ឬអេតាណុល។ វាអាចធ្វើឲ្យ Phlebotomine ទន់  
 និងសម្អាតបានយ៉ាងឆាប់រហ័ស  
 ដោយបន្ថយភាពរឹងរបស់ cuticle  
 អនុញ្ញាតឲ្យរៀបចំទីតាំងសំណាកបានត្រឹមត្រូវ  
 ជាពិសេសមានប្រយោជន៍សម្រាប់ការពន្លាយស្លាប  
 ឬការវះកាត់ប្រដាប់ភេទ) genitalia)។  
 ទោះបីមានរបាយការណ៍ថាអាចរក្សាទុកបានរយៈពេលវែង  
 ក៏ដោយ

រយៈពេលពិតប្រាកដនៃការអភិរក្សនៅតែមិនប្រាកដច្បា  
 ស់។  
 កំណត់ហេតុចម្បងនៃថ្នាលនេះស្ថិតនៅក្នុងសមាសធាតុដៃ  
 លមាន phenol ដែលសារធាតុពុល និងបង្កការរលាក  
 តម្រូវឲ្យមានការប្រុងប្រយ័ត្នក្នុងការប្រើប្រាស់។

ការរៀបចំសំណាកលើកញ្ចក់ឡាម សម្រាប់រយៈពេលយូរ  
 )Permanent mounting)  
 Canada balsam (RI = 1.52–1.54)  
 Canada balsam  
 ត្រូវបានពិពណ៌នាលើកដំបូងថាជាថ្នាល mounting សមស្រប  
 សម្រាប់មីក្រូទស្សន៍ពន្លឺបញ្ជូន) transmitted light  
 microscopy) ដោយ Andrew Pritchard នៅទសវត្សរ៍ឆ្នាំ  
 1830។  
 វានៅតែជាថ្នាលមួយដែលត្រូវបានប្រើយ៉ាងទូលំទូលាយ  
 ដោយសារគុណភាពរក្សាទុកយូរអង្វែងដែលបានបញ្ជាក់ជា  
 កំស្លែងជាង 150 ឆ្នាំនៃការអនុវត្តជោគជ័យ។ ខុសពីថ្នាល  
 Hoyer, Canada balsam  
 មិនបង្កើតគ្រីស្តាល់និងមិនស្របសំណើម។ ទោះយ៉ាងណា  
 Canada balsam មានលក្ខណៈ autofluorescent ឆ្នាំង  
 ដែលអាចក្លាយជាគុណវិបត្តិសម្រាប់បច្ចេកទេសមីក្រូទស្ស  
 ន៍មួយចំនួន] 60]។ ការប្រើប្រាស់រវាងរលាយមិនពុល ជំនួស  
 xylene  
 អាចកាត់បន្ថយហានិភ័យសុវត្ថិភាពក្នុងដំណើរការវិភាគ  
 រៀបចំ ប៉ុន្តែអាចបង្កើតគុណវិបត្តិដូចជា ពេលវេលាវិស្វកម្ម  
 និងការប្រែពណ៌ដីតលឿនជាងមុន។

Euparal® (RI = 1.48)  
 Euparal®  
 គឺជាជម្រើសមួយដែលត្រូវបានប្រើយ៉ាងទូលំទូលាយ ជំនួស  
 Canada balsam សម្រាប់ការ mounting ថ្នាល  
 ដោយផ្តល់នូវស្ថេរភាពរយៈពេលវែងល្អ  
 និងសន្តិសុខចំពោះពន្លឺ) refractive index)  
 ប្រហាក់ប្រហែល។ Euparal®  
 មានលក្ខណៈសំខាន់ដូចខាងក្រោម៖

តម្រូវឲ្យដកទឹក) dehydration requirement)៖  
 មុនការផ្ទេរចុងក្រោយទៅថ្នាល mounting  
 សំណាកត្រូវតែដកទឹកជាមុន  
 ជាទូទៅផ្លាស់ប្តូរពីអេតាណុល 95% ទៅអេតាណុលបរិសុទ្ធ  
 )absolute ethanol)។

ពេលដំណើរការវិភាគយូរ) extended processing time)៖  
 ការកំឡើងចុងក្រោយក្នុងវេស៊ីន មិនថា Canada balsam ឬ  
 Euparal® ទេ ត្រូវការដំណើរការដកទឹក  
 ដែលបន្ថែមរយៈពេលសរុបនៃការរៀបចំសំណាក។

នៅពេលមិនអាចដកទឹកដោយអង្គធាតុរំលាយជាមួយ  
 សេរីវាដូ  
 សំណាកដែលបានដកចេញពីអេតាណុលបរិសុទ្ធអាចដាក់  
 ក្នុងសូលុយស្យុងថ្នាលមួយដែលជាល្បាយស្មើគ្នារវាង  
 Euparal® និង Euparal essence មុន Mount ចុងក្រោយ។

Enecê (RI = 1.467)

Enecê

គឺជាថ្នាលmountingមានមូលដ្ឋានលើរេស៊ីនដែលត្រូវបានប្រើជាចម្បងសម្រាប់ Sand flies ហើយមានប្រជាប្រិយភាពជាពិសេសនៅប្រទេសប្រេស៊ីល។ មូលដ្ឋានរបស់វាមាន colophony និង gum copal ដែលរលាយក្នុងអាណូកុល camphor essence of turpentine និង eucalyptol។ Cerqueira [11] បានពិពណ៌នា Enecê ថាជាជម្រើសជំនួស Canada balsam សម្រាប់ការmountingកញ្ចក់ឡាមថេរនៃដំណាក់កាល larva, exuviae នៃដំណាក់កាលមិនពេញវ័យ និងសូម្បីតែសត្វមូសពេញវ័យ ហើយបន្ទាប់មកវាត្រូវបានទទួលយកយ៉ាងទូលំទូលាយសម្រាប់ការ Mount sand flies ។ Enecê ផ្តល់ជាជម្រើសមានប្រសិទ្ធភាពផ្នែកចំណាយសម្រាប់ការដាក់ Mount ថេរ ដោយផ្តល់ស្ថេរភាពរយៈពេលវែង និងពេលវេលាគ្រប់គ្រាន់ អនុញ្ញាតឱ្យអនុវត្តការរៀបចំ និងរៀបចំរចនាសម្ព័ន្ធរូបសាស្ត្រ) morphological structures) បានយ៉ាងត្រឹមត្រូវ។

5.4. ការរៀបចំកញ្ចក់ឡាម

និងការសម្អាតការសម្អាតកញ្ចក់ឡាមដែលបានmounting យ៉ាងត្រឹមត្រូវ មានសារៈសំខាន់ខ្លាំង ដើម្បីធានាស្ថេរភាព និងការអភិរក្សរយៈពេលវែង។ កញ្ចក់ឡាមត្រូវតែសម្អាតឱ្យពេញលេញមុនពេលពិចារណាទុករក្សារយៈពេលវែង។ ដើម្បីទទួលបានលទ្ធផលល្អបំផុត ស្លាយដែលបានmountingដោយថ្នាលmountingថេរ (permanent mounting media) គួរតែសម្អាតក្នុងទឹកាំងផ្នែក រយៈពេល ២-៣ សប្តាហ៍ ខណៈដែលស្លាយដែលរៀបចំដោយថ្នាលពាក់កណ្តាលថេរ (semi-permanent media) អាចត្រូវការត្រឹមតែ ១-២ សប្តាហ៍ប៉ុណ្ណោះ។

ដើម្បីធានាដំណើរការវិភាគសម្អាតមានប្រសិទ្ធភាព គួរប្រើឧបករណ៍អាំងកុយបាទីរ (incubator) ដែលកំណត់សីតុណ្ហភាពសមស្របទៅនឹងថ្នាល Mounting ដែលកំពុងប្រើប្រាស់ដោយជៀសវាងកម្ដៅលើសកម្រិតដែលអាចបង្កការខូចខាតដល់សំណាក។ ជួរសីតុណ្ហភាពណែនាំគឺ 30°C ដល់ 37°C។ ជំហានសម្អាតនេះមានសារៈសំខាន់ ដើម្បីបង្ការការរៀបចំស្លាយ (slide warping) ការខូចខាតសំណាក ឬអស្ថេរភាពនៃថ្នាលmounting ក្នុងអំឡុងពេលរក្សាទុក។

ថ្នាល Mounting ដែលប្រើក្នុងការរៀបចំកញ្ចក់ឡាម ត្រូវតែបញ្ជាក់ជានិច្ចលើស្លាកកញ្ចក់ឡាម (slide label)។ ប្រសិនបើអាចធ្វើបាន ស្លាកគួររួមបញ្ចូលរូបមន្តជាក់លាក់ដែលបានប្រើឈ្មោះអ្នករៀបចំ (preparator) និងកាលបរិច្ឆេទរៀបចំ។ ជាទូទៅ កញ្ចក់ឡាមត្រូវបានរៀបចំដំបូងជាការmountingបណ្តោះអាសន្ន (temporary mounts) មិនមានគោលបំណងសម្រាប់ការអភិរក្សរយៈពេលវែង។

ទោះយ៉ាងណា ប្រសិនបើស្ថានភាពសំណាកផ្លាស់ប្តូរ ដូចជា ត្រូវបានកំណត់ជាផ្នែកមួយនៃសេរី “type” សម្រាប់វិទ្យាសាស្ត្រប្រភេទវិភាគ (taxonomic study) ត្រូវប្រើថ្នាលmountingថេរជាមុន ដើម្បីធានាការអភិរក្សសម្រាប់ការសិក្សាពេលអនាគត។

5.5. បច្ចេកទេស Mount ជាជម្រើស៖ Card mounting

Card mounting គឺជាបច្ចេកទេសមួយដែលប្រើសម្រាប់ក្រុម sand flies ជាច្រើន ដោយអាចចាក់ម្ហូបភ្ជាប់សំណាកដោយផ្ទាល់លើកាតអេនតូម៉ូឡូស៊ី (entomological cards) ឬបិទភ្ជាប់លើផ្នែកកាត។ ទោះបីជាយ៉ាងណា ពិសេស៖ sand flies មានទំហំតូចខ្លាំងនិងត្រូវសង្កេតសេរីវាងខាងក្នុងសម្រាប់ ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ តាមរយៈដំណើរការវិភាគធ្វើឱ្យផ្លា (clarification; សូមមើលចំណុច ៥ (វិធីសាស្ត្រនេះមិនសមស្របឡើយសម្រាប់ការmounting sand flies ។

5.6. mountingឡើងវិញនៃសំណាកដែលខូចខាត (Remounting damaged specimens)

សម្រាប់សំណាកកម្រ ឬមានតម្លៃខ្ពស់គេណែនាំឱ្យអនុវត្តវិធីសាស្ត្រពីដំណាក់កាល



រូបភាពទី ៩៖ ស្លាបដើម) raw wing) របស់ Trichophoromyia ininii។

ដូចបានបង្ហាញក្នុងវីដេអូដែលអាចចូលប្រើបានតាមកំណត់៖ <https://zenodo.org/records/18315029> ១ (ការបង្កើនសំណើមឡើងវិញ) ការដកជាតិទឹកឡើងវិញ ដោយមិនបំបែកកញ្ចក់ឡាម គួរដាក់ឧបករណ៍ទ្រាប់សម្រាប់កញ្ចក់ឡាមមីក្រូទស្សន៍ជាច្រើនក្នុងបាន Petri ដើម្បីធ្វើជាគ្រឿងទ្រាប់។ បន្ទាប់មក ដាក់កញ្ចក់ឡាមដែលត្រូវបង្កើនសំណើមឡើងវិញនៅផ្នែកខាងលើ ហើយបន្ថែមអង្កាតុរលាយបន្តិចបន្តួច) កម្រិតប៉ុន្មានមីលីម៉ែត្រ (ក្នុងបាន Petri ដើម្បីបង្កើតបន្ទប់សើម) humid chamber) ដោយធានាថាកញ្ចក់ឡាមមិនប៉ះទង្គិចដោយផ្ទាល់ជាមួយ

អង្គធាតុរំលាយ) សូមមើល រូបភាពទី ៨ D)។  
 រយៈពេលត្រូវការសម្រាប់ការបង្កើនសំណើមឡើងវិញ  
 អាចខុសគ្នាពីមួយថ្ងៃដល់ច្រើនថ្ងៃ  
 អាស្រ័យលើស្ថានភាពសំណាក។ ត្រូវត្រួតពិនិត្យរៀងរាល់ថ្ងៃ  
 និងមានការអត់ធ្មត់។  
 បន្ទាប់ពីកញ្ចក់ឡាមបានបង្កើនសំណើមគ្រប់គ្រាន់  
 អាចយកចេញពីបន្ទប់សើម  
 ហើយដាក់ក្នុងអាងកុយបាទីរ រយៈពេលពីរបីម៉ោង  
 មុនការពិនិត្យក្រោមមីក្រូទស្សន៍ ការថតរូប  
 ឬការគូរការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រសាស្ត្រ។ ២ (   
 ការ mounting ឡើងវិញ) Remounting)  
 កញ្ចក់ឡាមអាចត្រូវបានដាក់ត្រឡប់ទៅបន្ទប់សើមបន្ថែម  
 ម្តងវិញ ឬមួយយប់ មុនធ្វើការបំបែក។  
 ការបំបែកគួរអនុវត្តក្រោមមីក្រូទស្សន៍ប៊ីណុកុលារ  
 )binocular microscope)។ ដោយប្រើម្លូលព្រឹក  
 ត្រូវដោះតម្របឡាមើលយ៉ាងប្រុងប្រយ័ត្នដើម្បីធានាថាគ្មាន  
 នីតិវិធីណាមួយនៃ Phlebotomine sand flies  
 នៅជាប់លើកម្របកញ្ចក់។ បន្ទាប់មក  
 ត្រូវប្រមូលសារធាតុដែលបានរក្សាទុករបស់ Phlebotomine  
 sand flies រួចហើយលាងជាមួយទឹកក្នុងអាងតូចៗ) small  
 wells) ដូចដែលប្រើសម្រាប់ការដកស្រង់ DNA/RNA  
 ប្រភេទបំផ្លាញសំណាក) destructive extraction)  
 មុនពេលបាត់ទឹក និង mounting ឡើងវិញក្នុងថ្នាំរលីន។  
 នៅពេលបំបែកកញ្ចក់ឡាមមានសារៈសំខាន់ខ្លាំងក្នុងការ  
 កំណត់អត្តសញ្ញាណថ្នាំ mounting  
 ដើម្បីជ្រើសរើសរាវរំលាយសមស្រប។

- សម្រាប់ថ្នាំរលីនមានមូលដ្ឋានលើទឹក ត្រូវប្រើទឹក។
- ប្រសិនបើថ្នាំរលីនមានមូលដ្ឋានលើរេស៊ីន) ឧទាហរណ៍  
 Canada balsam ឬ Euparal®) ត្រូវប្រើ xylene  
 ក្រោមនូវបង្ហូរខ្យល់( fume hood)  
 និងត្រូវពាក់ឧបករណ៍ការពារផ្ទាល់ខ្លួនសមស្រប  
 រួមទាំងម៉ាស់ការពារ។

ការ mounting ឡើងវិញនៃសំណាក “ type”  
 ឬសំណាកក្នុងសារមន្ទីរត្រូវអនុវត្តតែប៉ុណ្ណោះក្រោយពេលទ  
 ទទួលបានការយល់ព្រមពីអ្នកថែរក្សាសំណាក) curator)  
 និង/ឬស្ថាប័នដែលកាន់កាប់សំណាកនោះ។

## 6. ការកំណត់អត្តសញ្ញាណសំណាក (Specimen identification)

### 6.1. រូបសាស្ត្រ(Morphology)

ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ sand flies  
 អាស្រ័យជាចម្បងលើការពិនិត្យលក្ខណៈរូបសាស្ត្ររួមមាន  
 រូបរាង thorax ស្លាប ប្រដាប់ភេទ) genitalia) រោម (setae)  
 និងទំនាក់ទំនងម៉ូរហូមេត្រី) morphometric relationships)  
 រវាងចនាសម្ព័ន្ធផ្សេងៗ។  
 អ្នកស្រាវជ្រាវប្រើសោវចនាទ្រឹស្តីតាក់សូណូមី) taxonomic  
 keys) សំណុំសំណាកយោង) reference collections)

និងការពិពណ៌នាប្រភេទដើម  
 ដើម្បីប្រៀបធៀបសំណាកដែលប្រមូលបានជាមួយតាក់សូ  
 ងដែលបានស្គាល់រួច។ លក្ខណៈវិនិច្ឆ័យសំខាន់ៗ  
 ដូចជាលំនាំសរសៃស្លាប) wing venation)  
 និងម៉ូរហូមេត្រីស៊ីក្សាល នៅទាំងភេទប្រុស  
 និងញីចនាសម្ព័ន្ធប្រដាប់ភេទភេទឈ្មោល  
 និងចនាសម្ព័ន្ធចងផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae)  
 ភេទញីមានសារៈសំខាន់ខ្លាំងសម្រាប់ការកំណត់ប្រភេទ។  
 ការកំណត់អត្តសញ្ញាណឱ្យបានត្រឹមត្រូវ  
 តម្រូវឱ្យមានការពិនិត្យក្រោមមីក្រូទស្សន៍យ៉ាងលម្អិត  
 ជាទូទៅប្រើមីក្រូទស្សន៍សមាស) compound microscope)  
 សម្រាប់សង្កេតចនាសម្ព័ន្ធព្រឹកដូចជា genitalia  
 និងចងផ្ទុកទឹកកាមញី (spermathecae) ឬប្រើ  
 stereomicroscope សម្រាប់លក្ខណៈម៉ូរហូមេត្រីស៊ីក្សាល។  
 ការវិភាគមើលបច្ចេកវិទ្យារូបភាពឌីជីថល  
 បានជួយសម្រួលការប្រើរូបភាពគុណភាពខ្ពស់  
 ឬកំនុះឌីជីថលនៃលក្ខណៈសំខាន់ៗ  
 សម្រាប់ប្រៀបធៀបជាមួយឯកសារយោង  
 ឬវិភាគតាមប្រព័ន្ធកុំព្យូទ័រជំនួយការកំណត់អត្តសញ្ញាណ  
 ដែលបង្កើនភាពត្រឹមត្រូវ  
 និងភាពងាយស្រួលក្នុងការកំណត់ម៉ូរហូមេត្រីស៊ី។

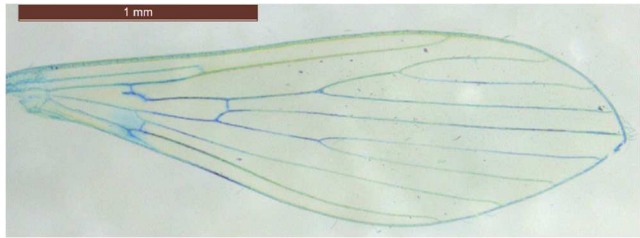
### 6.2. ការសិក្សាពីការតំរៀបសរសៃនៅលើស្លាប) Wing geometry)

ការសិក្សាពីការតំរៀបសរសៃនៅលើស្លាប  
 ជាលក្ខណៈសំខាន់មួយសម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណ  
 និងចាត់ថ្នាក់ប្រភេទ sand flies ផ្សេងៗ។ ស្លាបរបស់ sand  
 flies មានលំនាំនិងចនាសម្ព័ន្ធពិសេស  
 ជាទូទៅវែងនិងតូចចង្អៀត  
 មានសរសៃវែងនៃស្លាបអភិវឌ្ឍន៍) រូបភាពទី ៩ និង ១០(។  
 ការតំរៀបសរសៃនៃស្លាបបង្កើតលំនាំពិសេស  
 ដែលអាចខុសគ្នាតាមពួក (genus) និង ប្រភេទ (species)  
 ដែលផ្តល់លក្ខណៈវិនិច្ឆ័យពេញលេញសម្រាប់ការកំណត់អត្ត  
 សញ្ញាណ។  
 ដូច្នេះការសិក្សាពីការតំរៀបសរសៃនៅលើស្លាបមានសារៈសំ  
 ខាន់សម្រាប់តាក់សូណូមី។

### 6.3. ជីអូមេត្រីម៉ូរហូមេត្រីស្លាប) Wing geometric morphometrics)

អ្នកស្រាវជ្រាវប្រើបច្ចេកទេសជាច្រើន ដូចជា geometric  
 morphometrics ដើម្បីវិភាគ និងប្រៀបធៀបរាង  
 និងទំហំស្លាប រវាងប្រភេទ ឬប្រជាសាស្ត្រ sand flies ផ្សេងៗ។  
 ការសិក្សាពីការតំរៀបសរសៃនៅលើស្លាប  
 អាចផ្តល់ព័ត៌មានសំខាន់អំពីភារិយាបថ  
 ជម្រើសលំនៅដ្ឋាន និងសមត្ថភាពហោះហើរ។  
 ក្នុងវិធីសាស្ត្រ geometric morphometrics  
 ស្លាបត្រូវបានរក្សាទុកយ៉ាងប្រុងប្រយ័ត្ន ពណ៌ស្លាម) stained)  
 ប្រសិនបើចាំបាច់ ហើយ Mounting ផ្ទាបលើកញ្ចក់ឡាម។

បន្ទាប់មក កញ្ចក់ឡាមត្រូវថតរូបក្រោម stereomicroscope បំប្លែងជាទិន្នន័យឌីជីថល និងវិភាគម៉ូរហូមេត្រី។ អនុវត្តន៍នេះត្រូវបានពិពណ៌នាយ៉ាងលម្អិតក្នុងអត្ថបទ យោង] 6, 27, 42, 56, 57, 59] ហើយណែនាំឱ្យប្រើស្លាបខាងស្តាំ ឬខាងឆ្វេងជាប់លាប់ សម្រាប់សវិភាគ ដើម្បីជៀសវាងផលប៉ះពាល់ allometry អវិជ្ជមាន] 62]។



រូបភាពទី ១០: ស្លាបមានពណ៌ របស់ *Phlebotomus ariasi*។

ការរៀបចំស្លាបសម្រាប់ geometric morphometric analysis

ដើម្បីឱ្យមើលឃើញសរសៃនៅលើស្លាបបានច្បាស់ ស្លាបត្រូវសម្អាតស្រទាប់ស្រកាវ) scales( និងពណ៌ស្នាម។ ដំបូងត្រូវបំពេញអាងតូច) small wells ដោយសម្រាប់សម្អាតមេត្រីលីន) methylene blue អេតានុល ទឹក និង xylene substitute)។ យកស្លាបដែលរក្សាទុកក្នុងអេតានុល 70% នៅស៊ីក្លូណូភាពបន្ទប់ដោយក្រឡក់បំពង់ទីប Eppendorf ហើយចាក់លើអាង

បន្ទាប់មកយកស្លាបឡើងដោយម្តួលកោងល្អិត។ ផ្លាស់ប្តូរស្លាបពីអេតានុលទៅទឹក ហើយត្រឡប់ទៅអេតានុលវិញ ដើម្បីយក bristles ចេញ។ ដាក់ស្លាបក្នុង methylene blue រយៈពេល ៦ នាទីដោយធានាថាវាអណ្តែត។ បន្ទាប់មកយកស្លាបដាក់ក្នុង xylene substitute រយៈពេល ២ នាទី) ប្រហែលមួយភាគបីនៃពេល methylene blue) ដើម្បីធ្វើការតំរូវពណ៌។ ចុងក្រោយដាក់ស្លាបលើបន្ទះ Euparal® តូចមួយលើកញ្ចក់ឡាម ហើយបើកស្លាបយ៉ាងប្រុងប្រយ័ត្នក្រោមកែវពង្រីកដាក់ឡាម ម៉ែល។ ត្រូវថតរូបឱ្យបាននាប់មុនពេល Euparal® កក ព្រោះអាចត្រូវកែតម្រូវទីតាំងស្លាបបន្តិច។

**6.4. បច្ចេកទេសម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ (Molecular biology techniques)**

ក្រៅពីលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ វិធីសាស្ត្រម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រកាន់តែមានសារៈសំខាន់ក្នុង ស្រាវជ្រាវទាក់ទងនឹង sand flies រួមមានវិទ្យាសាស្ត្រកំណត់ប្រភេទ ភ្នាក់ស្នូលមី ហ្សែននៃប្រជាសាស្ត្រភ្នាក់ស្នូល ការរកវត្តមាន DNA/RNA

មេរោគបង្កជម្ងឺ ការកំណត់ប្រភេទ និងគរិយាបថរបស់ភ្នាក់ងារចម្លងជម្ងឺ ក្នុងវិស័យនៃវិទ្យាសាស្ត្រសិក្សាអំពីជម្ងឺឆ្លង [70]។

DNA sequencing អាចប្រើសម្រាប់បញ្ជាក់ប្រភេទ ឬបញ្ជាក់ប្រភេទណាដែលលក្ខណៈរូបសាស្ត្រស្រដៀងគ្នាខ្លាំង ដែលផ្តល់ភាពត្រឹមត្រូវខ្ពស់។ បច្ចេកទេសដូចជា PCR, DNA sequencing, NGS និង MALDI-ToF MS កំពុងកើនសារៈសំខាន់សម្រាប់ការកំណត់អត្តសញ្ញាណលើ ន និងត្រីមត្រូវ [46] ។ ទោះយ៉ាងណាការសិក្សាលក្ខណៈរូបសាស្ត្រនៅតែជាមូលដ្ឋានស្តង់ដារសម្រាប់វិទ្យាសាស្ត្រកំណត់ប្រភេទ ភ្នាក់ស្នូលមី។

**6.4.1. ការដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីត (Destructive nucleic acid extraction)**

ការដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតគឺជាវិធីសាស្ត្រពេញនិយមមួយ ក្នុងការសិក្សាជីវវិទ្យា ហើយមានវិធីសាស្ត្រផ្សេងៗដែលបានអភិវឌ្ឍឡើងសម្រាប់ ការដក DNA ពីសម្ភារៈជីវចម្បង [48]។ កញ្ចប់ដក DNA ជាច្រើនត្រូវបានរចនាឡើងដើម្បីជួយសម្រួលដំណើរការវិ ភាគនេះ [14]។ ទោះយ៉ាងណា វិធីសាស្ត្រដែលប្រើជាធម្មតាសម្រាប់រៀបចំសំណុំអត្តសញ្ញាណសម្រាប់ការកំណត់សម្ភារៈភាគការវិភាគលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ អាចរាំងខ្ទប់ការវិភាគ DNA ព្រោះបច្ចេកទេសទាំងនេះអាចបំផ្លាញឬបំផ្លាញលក្ខណៈរូបសាស្ត្រ កាយសំខាន់ៗនៃសម្ភារៈ [10]។ ប្រភេទនិងសភាពសម្ភារៈមានតួនាទីសំខាន់ក្នុងការជ្រើស រើសវិធីសាស្ត្រដក DNA ឱ្យសមស្រប [29]។

តម្រូវការសម្រាប់ការកំណត់ Sand files យ៉ាងត្រឹមត្រូវ ការយល់ដឹងអំពីសមាមាត្រពូជ និងកាត់បន្ថយហ្វែនមីនត្រូវការ ដូចនេះជំរុញឱ្យមានការអភិវឌ្ឍលើឧបករណ៍ធ្វើរោគវិនិច្ឆ័យសម្រាប់ម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រ [23]។ វិធីសាស្ត្រម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្របានប្រើជាញឹកញាប់ដើម្បីប ន្ថែមជាមួយវិធីសាស្ត្រទូទៅក្នុងវិទ្យាសាស្ត្រដើម្បីកំណត់ប្រ ភេទសត្វ (taxonomic) សម្រាប់ការកំណត់ Sand files ។ ឧទាហរណ៍វិធីសាស្ត្រដកសម្រាប់ insect barcoding គឺអាចរាប់បញ្ចូលការដក DNA ការលំអិតហ្វែន និងការខូចខាតសំណាកដើម។ ដូច្នេះ មានការតម្រូវយ៉ាងខ្លាំងក្នុងការស្រាវជ្រាវវិធីសាស្ត្រដក DNA ដែលមិនបំផ្លាញ (non-destructive) ដើម្បីរក្សាទុកទាំងសម្ភារៈជីវសាស្ត្រ និងភាពសំខាន់របស់វាដកាយ។

វិធីសាស្ត្រដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតជាច្រើនត្រូវបានអនុវ ត្តលើ Sand files ។ បរិមាណបុគ្គលភាពនៃអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតដែលត្រូវការអា ស្រ័យលើវិភាគម៉ូលេគុលជីវសាស្ត្រនៅលើប្រក្រាម ពីព្រោះបច្ចេកទេសផ្សេងៗមានសមត្ថភាព និងតម្រូវការសុទ្ធភាពខុសគ្នា [9]។ ឧទាហរណ៍ ភ្នែក Sand files ត្រូវបានរកឃើញអាចរារាំងការស្វ័យដំឡើង PCR

[69]។ លើសពីការត្រួតពិនិត្យភ្នាក់ងារកំបង់រោគ DNA Sand files ត្រូវបានដកជាប្រចាំសម្រាប់កំណត់ប្រភេទ។ វិធីសាស្ត្រដក DNA ផ្សេងៗអាចប្រើបាន ទោះបីជាបរិមាណ និងគុណភាពខុសគ្នានៅក្នុងបច្ចេកទេសផ្សេងៗ។ ប៉ុន្តែវិធីសាស្ត្រដែលអ្នកផលិតបានបង្កើត ត្រូវបានអ្នកស្រាវជ្រាវប្រើប្រាស់សម្រាប់ Sand files [8] ដើម្បីបង្កើនបរិមាណ និង/ឬគុណភាពនៃអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតដែលបានដក [8, 9, 69]។ ការបម្លែងផ្សេងទៀត ដែលបានអភិវឌ្ឍសម្រាប់អត្តសញ្ញាណផ្សេងទៀតក៏អាចប្រើ សម្រាប់ Sand files បានផងដែរ [58, 76]។ PCR សម្រាប់កំណត់ប្រភេទដោយកំណត់គោលដៅលើបំណែក ហ្សែនមីតូកុងទ្រី (COI ឬ CytB) ជាទូទៅសមស្របទៅជាមួយវិធីសាស្ត្រដក DNA ដែលមានការបំបែកបំណែក DNA កម្រិតខ្ពស់។ ប៉ុន្តែ NGS បែប long-read (Oxford Nanopore និង PacBio) តម្រូវឱ្យមានកម្រិតបំបែកបំណែក DNA តិច និងគុណភាព DNA ខ្ពស់។ ការដក DNA ជាមូលដ្ឋានប្រើ spin column ជាទូទៅផ្តល់បរិមាណជារួបរួមកំណាង DNA genomic ដល់ប្រហែល 60 kb ខណៈដែល phenol-chloroform អាចផ្តល់បានដល់ 150 kb [77]។ តារាង 5 សង្ខេបពីវិធីសាស្ត្រផ្សេងៗក្នុងការដក DNA Sand file និងបង្ហាញថា តើមានការបម្លែងវិធីសាស្ត្រសម្រាប់សត្វទាំងនេះ ឬអត្តសញ្ញាណសត្វផ្សេងៗឬទេ។ បរិមាណមិនត្រូវបង្ហាញ ព្រោះវាអាស្រ័យលើទំហំសំណាក និងវិធីសាស្ត្ររៀបចំ។ ជួរមួយសង្ខេបបញ្ជាក់ពីការបម្លែងនៃប្រព័ន្ធការដក DNA សម្រាប់ Sand file ឬអត្តសញ្ញាណសត្វផ្សេងៗ។

ការជ្រើសរើសវិធីសាស្ត្រដក DNA គួរត្រូវគិតគូរជាមួយលក្ខខណ្ឌជាច្រើនដូចជា ចំនួនសំណាក ពេលវេលាដក និងបច្ចេកទេសដែលប្រើនៅលំហក្រោយ (downstream)។ ខណៈដែល NGS តម្រូវឱ្យមានទម្ងន់ម៉ូលេគុលរបស់ DNA genomic ក្នុងកម្រិតខ្ពស់ វិធីសាស្ត្រទាំងអស់នៅទីនេះអាចប្រើសម្រាប់កម្មវិធី PCR ធម្មតា។ លើសពីនេះ ក៏មានការសិក្សាច្រើនបានស្រាវជ្រាវវិធីសាស្ត្រដក DNA ដោយមិនបំផ្លាញសម្រាប់អត្តសញ្ញាណសត្វដីតូច សំណុំសត្វសារមន្ទីររក្សាឯកសារស្លឹក និងអត្តសញ្ញាណខ្សែទន់ [19, 26, 28, 55, 63]។

**តារាង 5:** កម្រិត និងការបង្កើនប្រព័ន្ធសម្រាប់ការដករបស់សត្វស្បែកខ្សាច់ phlebotomine. ការប្រើប្រាស់ gDNA

ប្រភេទសត្វ	ថ្លៃដើម	កម្មវិធីប្រើប្រាស់	ការកែសម្រួលប្រតិបត្តិសម្រាប់ arthropods តូចៗ
ជួរឈររង្វិល (Spin column)	២ - ៥.៥៥.៣ ដុល្លារអាមេរិក [៣៩]	PCR, NGS	[៩]
ហ្វេណុល-លីហ្វូម៉ូក (Phenol-chloroform)	០.១៥ ដុល្លារអាមេរិក [៦៩]	PCR, NGS	[៩]
ហត់ស្តូត (HotSHOT)	< ០ ០១. ដុល្លារអាមេរិក [៦៩]	PCR	-
សាល់ធីងអោត (Salting out)	០ ១២. ដុល្លារអាមេរិក [៦៩]	PCR	-
ឆេឡិច (Chelex)	០ ០២. ដុល្លារអាមេរិក [៤១]	PCR	[៤១, ៧៦]

**6.4.2. ការដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតមិនបំផ្លាញសំណាក (Non-destructive nucleic acid extraction)**

មួយក្នុងចំណោមបញ្ហាសំខាន់ៗក្នុងវិភាគម៉ូលេគុលជីវនៃអត្តរូបស ជាពិសេស Sand file គឺការរក្សាសម្ភារៈសម្រាប់បញ្ជូនក្នុងបណ្តាញយសត្វវិទ្យា។ វិធីសាស្ត្រដក DNA ភាគច្រើនតម្រូវឱ្យ maceration ឬបំផ្លាញសំណាក ដូច្នេះអាចប៉ះពាល់ដល់ការរក្សាសំណាកដើម។ ទោះយ៉ាងណា វិធីសាស្ត្រដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតដោយមិនបំផ្លាញ (non-destructive) ត្រូវបានរចនាឡើងដើម្បីដកសម្ភារៈជាតិសារព (genética) ដោយមិនបំផ្លាញរាងកាយសំណាក (ទោះបីជាការប៉ះពាល់ដល់ជីវភាព (viability) ឬបង្កើនរាងកាយ (morphology) នោះក៏ដោយ។ វិធីសាស្ត្រទាំងនេះមានតម្លៃពិសេសពេលប្រើលើសំណាកមានតម្លៃ ឬមានកំណត់ ដូចជា Sand file ដែលការរក្សាភាពស្ថិតស្ថេរ និងរចនាសម្ព័ន្ធគឺសំខាន់សម្រាប់ការសិក្សាកំណត់ប្រភេទ (taxonomy) រាងកាយវិទ្យា (morphology) ឬគោលបំណងរោគវិនិច្ឆ័យ (diagnostic purposes) នៅអនាគត។ វិធីសាស្ត្រដែលប្រើជាញឹកញាប់មួយគឺវិធី non-destructive bathing ដែល Sand file

ត្រូវបានដាក់អោយស្ងៀម ហើយត្រូវហូបក្នុង lysis buffer ដែលមាន proteinase K។

វិធីសាស្ត្រ mild-vectolysis ត្រូវបានអនុវត្តជោគជ័យលើ Sand file ជាពិសេសសម្រាប់ប្រភេទសំណាក [24]។ វិធីសាស្ត្រនេះប្រើឧបករណ៍ spin column ជាទូទៅ (ក្នុងករណីនេះ គឺ DNeasy Blood and Tissue kit, QIAGEN, Hilden, Germany) ដែលបានបង្កើតសម្រាប់ទទួល DNA ដោយមិនបំផ្លាញសំណាក។ ជំហាន lysis ដែលបានផ្លាស់ប្តូរ (បរិមាណ lysis buffer និងបន្ថែមជំហានបង្កក [17]) អាចអនុញ្ញាតឱ្យអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតត្រូវបានបញ្ចេញដើម្បីកាត់បន្ថយការខូចខាតរូបរាងកាយ [24]។

សម្រាប់ Sand file ក៏អាចប្រើវិធីសាស្ត្រ HotSHOT DNA Extraction kit (Bento Bioworks Ltd, London, United Kingdom) [73] បានផងដែរ ដែលមានដំណើរការលឿនរហ័ស និងមានថ្លៃសមរម្យ។ សម្ភារៈអត្តរូបសដែលមានគោលបំណងសម្រាប់ការកំណត់រាងកាយអាចស្តុកស្តុកក្រោយពេលដំណើរការវិភាគ។ សំណាកដែលប្រើ DNeasy Blood and Tissue kit ត្រូវបានសម្អាតដោយ Marc-André solution ខណៈដែលសំណាកដែលប្រើ HotSHOT DNA Extraction kit ត្រូវបានសម្អាតគ្រប់គ្រាន់សម្រាប់ mount ក្នុងម៉េឌៀមទឹក (aqueous medium) ឬល្អជាងនេះគឺក្នុង resin បន្ទាប់ពីការសម្អាត (dehydration) តាមប្រព័ន្ធលំអិតក្នុងអត្ថបទនេះ [73]។ សេនេទិចដែលបានដកអាចត្រូវបានដំណើរការវិភាគ downstream ដូចជា PCR ដើម្បីបង្កើនសញ្ញាសម្បត្តិ DNA ជាក់លាក់។ វិធីសាស្ត្រដកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីតដោយមិនបំផ្លាញសំណាក មានសារៈសំខាន់ក្នុងការសិក្សាសេនេទិចរបស់ Sand file រួមទាំងការកំណត់ក្នុងការបង្កើនរាងកាយដែលអាចមានក្នុងសត្វទាំងនេះផងដែរ។ ដោយរក្សាភាពស្ថិតស្ថេររបស់សំណាក អ្នកស្រាវជ្រាវអាចទទួលបានព័ត៌មានសេនេទិចដែលមានតម្លៃ ខណៈដែលរក្សាសំណាកសម្រាប់ការវិភាគបន្ថែម ឬការសិក្សា។

**6.5. MALDI-ToF MS**

MALDI-ToF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) គឺជាបច្ចេកវិទ្យាផ្អែកលើម៉ាសស្ទ៊ីចត្រូម៉ែត្រី ដែលបង្កើតឡើងសម្រាប់ស្ដេននិងវិភាគប្រូតេអ៊ីន (“ស្នាមម្រាមដៃ”) របស់សំណាកជីវសាស្ត្រ។ បច្ចេកវិទ្យា MALDI-ToF កំពុងទទួលស្គាល់ថាជាឧបករណ៍សំខាន់សម្រាប់ការកំណត់ប្រភេទអត្តរូបសដែលមានសារៈសំខាន់ក្នុងវេជ្ជសាស្ត្រ និងវេជ្ជសាស្ត្រសត្វ។ បច្ចេកវិទ្យានេះបានបង្ហាញប្រសិទ្ធភាពក្នុងការកំណត់វត្តអភិវឌ្ឍន៍របស់ Phlebotomine sand flies រួមទាំងទម្រង់មិនពេញវ័យ និងមូសពិដែលបំពេញដោយឈាម ហើយត្រូវបានអនុវត្តដោយជោគជ័យក្នុងការបំបែកមូស

ញី និងមូសឈ្មោលក្រោមលក្ខខណ្ឌស្តុកនិងការ Homogenize [28, 30, 73, 74]។ វិធីសាស្ត្រនេះផ្តល់នូវសមត្ថភាពបែងចែកខ្លួននៅលើកម្រិត (subgenera), ប្រភេទ (species), និងប្រជាជន (populations)។ បច្ចេកវិទ្យានេះអនុញ្ញាតឱ្យអ្នកស្រាវជ្រាវសម្រេចបានការកំណត់ប្រភេទយ៉ាងលឿន និងត្រឹមត្រូវដែលមានសារៈសំខាន់សម្រាប់ការយល់ដឹងអំពីការប្រមូលផ្តុំរបស់ Phlebotomine sand flies យុទ្ធសាស្ត្រផ្ទាល់ខ្លួន និងតួនាទីរបស់ពួកវានៅក្នុងការចម្លងជំងឺ។

ដោយភាពខុសគ្នារបស់ប្រភេទសត្វផ្អែកលើប្រូតេអ៊ីន MALDI-ToF មានតួនាទីសំខាន់ក្នុងការសិក្សាអំពីដេម៉ូសាស្ត្រ និងយុទ្ធសាស្ត្រគ្រប់គ្រងក្នុងការចម្លងជំងឺ។ មានកង្វះខាតសំខាន់ពីរដែលកំណត់ការប្រើប្រាស់ប្រចាំថ្ងៃរបស់វិធីសាស្ត្រនេះ៖ ១) គ្រឿងម៉ាសស៊ីចត្រូវម៉ែត្រមានតម្លៃខ្ពស់ និងពិបាកទិញសម្រាប់កំណត់ប្រភេទ Phlebotomine sand flies ឬក្នុងការចម្លង arthropod ជាទូទៅ (២) ទិន្នន័យយោងអំពី Phlebotomine sand flies មានតិចតួចមូលដ្ឋានទិន្នន័យសាធារណៈដែលចាំបាច់ត្រូវបង្កើតមូលដ្ឋានទិន្នន័យផ្ទាល់ខ្លួនដោយប្រើស្ថេរស្របធ្វើ reference spectra ពីសំណាកដែលកំណត់យ៉ាងច្បាស់រួចក្លាការវាយតម្លៃ morphological និងការតម្រៀប sequencing នៃ genetic marker សមស្រប) COI, cytB, ឬផ្សេងទៀត។ ការកំណត់នេះអាចត្រូវបានដោះស្រាយដោយការរួមបញ្ចូលទិន្នន័យយោង Phlebotomine sand flies ផ្ទាល់ខ្លួនទៅក្នុង MSI Platform ដែលគ្រប់គ្រងដោយ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Sorbonne University, France និងការប្រមូលផ្តុំ BCCM/IHEM/Sciensano នៅ Brussels, Belgium (<https://msi.happy-dev.fr/>)។

នៅពេលផែនការវិភាគប្រូតេអ៊ីន MALDI-ToF ត្រូវបានអនុវត្ត សំណាកត្រូវបានរក្សាទុកជាបង្កកស្ងួត (dry-frozen) ឬនៅក្នុងអេកាណុល 70% នៃ molecular grade ហើយមិនត្រូវប្រើសីតុណ្ហភាពបរិយាកាស។ ប្រសិនបើគ្មានការណែនាំសាកលសម្រាប់រៀបចំសំណាក, អ្នកប្រើប្រាស់ត្រូវបានផ្តល់យោគបល់ឱ្យប្រើ aqueous solution 60% acetonitrile/0.3% TFA រឺបស់ sinapinic acid (30 mg/mL) សម្រាប់ការរៀបចំ MALDI-ToF ដើម្បីធានាថា spectra ប្រូតេអ៊ីនអាចប្រៀបធៀបបានជាមួយទិន្នន័យដែលបានបោះពុម្ពមុននេះសម្រាប់ Phlebotomine sand flies។

ការត្រៀមសំណាកសម្រាប់ MALDI-ToF MS (រូបភាព 7) សំណាកសត្វល្អិត ដែលបានរក្សាទុកក្រោមលក្ខខណ្ឌផ្សេងៗ ត្រូវបានធ្វើអោយស្លកក្នុងខ្យល់នៅសីតុណ្ហភាពបន្ទប់ មុននឹងធ្វើការ dissect។ ក្បាល និងពោះត្រូវបានដកចេញ

ដើម្បីទទួលបានផ្នែករាងកាយដែលមានលក្ខណៈ morphological សំខាន់សម្រាប់ការ mount លើកញ្ចក់ឡាម និងវិភាគ morphological។ ផ្នែកទ្រូងអាចប្រើសម្រាប់ MALDI-ToF ហើយពោះដែលនៅសល់ ត្រូវបានរក្សាទុកសម្រាប់ការដក DNA។ សម្រាប់ protein profiling, ផ្នែកទ្រូងត្រូវបានកិនដោយដៃក្នុង microtubes 1.5 mL ជាមួយ 10 μL នៃសារធាតុរាវសម្រាប់ homogenization ដោយប្រើ pestles និង pellets ដែលអាចបោះចោលបាន។ ជាទូទៅ មានសារធាតុរាវសម្រាប់ homogenization ពីរដែលប្រើ៖ ទឹកស្រ្តីល្អិត (sterile distilled water) និង 25% formic acid។

**7. សេចក្តីសន្និដ្ឋាន**

ក្នុងការស្រាវជ្រាវនេះ យើងមានគោលបំណងផ្តល់វិធីសាស្ត្រដែលមានប្រសិទ្ធភាព ខ្ពស់សម្រាប់ការ mount sand flies ដែលបានប្តូរតាមគោលបំណងស្រាវជ្រាវជាក់លាក់ ដើម្បីជួយកំណត់ប្រភេទ និងសំគាល់ជំងឺបានត្រឹមត្រូវ។ គ្មានវិធីសាស្ត្រមួយណាដែលល្អបំផុតនោះទេ ប៉ុន្តែមានវិធីសាស្ត្រច្រើន ដែលម្នាក់ៗមានអត្ថប្រយោជន៍ និងកម្រិតកំណត់ខ្លួនឯង។

នៅក្នុងទិន្នន័យយោង យើងបានផ្តល់នូវព្រឹត្តិការណ៍លម្អិត (protocols) សម្រាប់បច្ចេកទេស mount ផ្សេងៗ ដែលប្រើសម្រាប់ការរៀបចំ និងកំណត់ប្រភេទ Phlebotomine sand flies។ ព្រឹត្តិការណ៍ទាំងនេះ រួមទាំងវិធីរួមប្រៀបផ្សំផ្តល់នូវជំហានបណ្តោះអាសន្ន (step-by-step) ដែលផ្តល់តាមគោលបំណងផ្សេងៗ ដើម្បីធានាថាលទ្ធផលមានភាពត្រឹមត្រូវ និងអាចទុកចិត្តបាន។ ដោយផ្តល់ធនធានទាំងនេះ យើងមានគោលបំណងគាំទ្រក្រុមស្រាវជ្រាវក្នុងការជ្រើសរើស និងអនុវត្តបច្ចេកទេសកំណត់សម្រាប់បង្កើនសម្របបំផុត សម្រាប់តម្រូវការជាក់លាក់របស់ពួកគេ។

**សេចក្តីអរគុណ**

អ្នកនិពន្ធសូមអរគុណ Richard Lane និង Zoe Jay Adams ពីសារមន្ទីរប្រវត្តិសាស្ត្រធម្មជាតិប្រទេសអង់គ្លេស (Natural History Museum of London, UK) សម្រាប់ការត្រួតពិនិត្យយ៉ាងល្អឥតខ្ចោះ ដែលបានបង្កើនគុណភាពនៃសេចក្តីស្រាវជ្រាវនេះ។

**មូលនិធិ**

យើងសូមទទួលស្គាល់អាជ្ញាធរអភិវឌ្ឍន៍ប្រទេសប្រេស៊ីល CNPq (លេខកំរណៈ:404395 /2024-4) និង Araucária Foundation (លេខកំរណៈ:433 / 2025PDI) ដែលបានផ្តល់មូលនិធិសម្រាប់ការស្រាវជ្រាវរបស់ AJA។

## ឆ្លោះផលប្រយោជន៍

Jérôme Depaquit ជា associate editor នៃ Parasite មិនបានចូលរួមក្នុងដំណើរការវិភាគពិនិត្យ និងសម្រេចចិត្តលើអត្ថបទនេះទេ។ អ្នកនឹងឃើញផ្សេងទៀត ប្រកាសថា មិនមានឆ្លោះផលប្រយោជន៍។

## សេចក្តីផ្តើមការណ៍អំពីភាពអាចរកបាននៃទិន្នន័យ

រីឯអ្នកត្រូវបានរក្សាទុកនៅក្នុង Zenodo។

រីឯអ្នក ១ : <https://zenodo.org/records/18198006>

រីឯអ្នក ២ : <https://zenodo.org/records/18311158>

រីឯអ្នក ៣ : <https://zenodo.org/records/18311106>

រីឯអ្នក ៤ : <https://zenodo.org/records/18311154>

រីឯអ្នក ៥ : <https://zenodo.org/records/18303014>

រីឯអ្នក ៦ : <https://zenodo.org/records/18302850>

រីឯអ្នក ៧ : <https://zenodo.org/records/18315029>

## ឯកសារបន្ថែម

ឯកសារបន្ថែមសម្រាប់អត្ថបទនេះអាចរកបាននៅ៖

<https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2026009/olm>

## ឯកសារយោង

- Alkan C, Allal-Ikhlef AB, Alwassouf S, Baklouti A, Piorkowski G, de Lamballerie X, Izri A, Charrel RN. 2015. Virus isolation, genetic characterization and seroprevalence of Toscana virus in Algeria. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(11), 1040 e1-9.
- Alten B, Ozbek Y, Ergunay K, Kasap OE, Cull B, Antoniou M, Velo E, Prudhomme J, Molina R, Banuls AL, Schaffner F, Hendrickx G, Van Bortel W, Medlock JM. 2015. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. *Bulletin of Entomological Research* 105(6), 664–678.
- Ayhan N, Baklouti A, Prudhomme J, Walder G, Amaro F, Alten B, Moutailler S, Ergunay K, Charrel RN, Huemer H. 2017. Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: Part I: Important points to consider *ante* field work. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 17(1), 73–80.
- Bates PA. 1997. Infection of phlebotomine sandflies with *Leishmania*, in *The Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A Methods Manual*. Springer. p. 112–120.5.
- Baum M, de Castro EA, Pinto MC, Goulart TM, Baura W, Klisiowicz Ddo R, Vieira da Costa-Ribeiro MC. 2015. Molecular detection of the blood meal source of sand flies (Diptera: Psychodidae) in a transmission area of American cutaneous leishmaniasis, Parana State, Brazil. *Acta Tropica*, 143, 8–12.
- Belen A, Alten B, Aytekin A. 2004. Altitudinal variation in morphometric and molecular characteristics of *Phlebotomus papatasi* populations. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(4), 343–350.
- Bhattacharya J, Chandra G, Hati AK. 1991. A simple method for cryopreservation of *Leishmania donovani* promastigotes, *Indian Journal of Medical Research*, 93, 245–246.
- Caligiuri LG, Sandoval AE, Miranda JC, Pessoa FA, Santini MS, Salomón OD, Secundino NF, McCarthy CB. 2019. Optimization of DNA extraction from individual sand flies for PCR amplification. *Methods and Protocols*, 2(2), 36.
- Casari AE, de Oliveira LP, Alonso DP, de Oliveira EF, Gomes Barrios SP, de Oliveira Moura Infran J, Fernandes WS, Oshiro ET, Ferreira AMT, Ribolla PEM, de Oliveira AG. 2017. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. *Experimental Parasitology*, 177, 66–72.
- Castalanelli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Footitt RG, Grimm M, Munyard K, Groth DM. 2010. A rapid non-destructive DNA extraction method for insects and other arthropods. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 243–248.
- Cerqueira NL. 1943. Um novo meio para montagem de pequenos insetos em lâmina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, (39), 37–41.
- Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP, Tenorio A, de Lamballerie X. 2005. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1657–1663.
- Chaskopoulou A, Giantsis IA, Demir S, Bon MC. 2016. Species composition, activity patterns and blood meal analysis of sand fly populations (Diptera: Psychodidae) in the metropolitan region of Thessaloniki, an endemic focus of canine leishmaniasis. *Acta Tropica*, 158, 170–176.
- Chen H, Rangasamy M, Tan SY, Wang H, Siegfried BD. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS One*, 5(8), e11963.
- Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry PE, Peyrefitte C. 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Eurosurveillance*, 15(10), 19507.
- Diamond LS, Herman CM. 1954. Incidence of Trypanosomes in the Canada Goose as revealed by bone marrow culture. *Journal of Parasitology*, 40(2), 195–202.
- Ding H, Torno M, Vongphayloth K, Ng G, Tan D, Sng W, Ho K, Randrianambinintsoa FJ, Depaquit J, Tan CH. 2025. Hidden in plain sight: discovery of sand flies in Singapore and description of four species new to science. *Parasites & Vectors*, 18(1), 402.
- Es-Sette N, Ajaoud M, Bichaud L, Hamdi S, Mellouki F, Charrel RN, Lemrani M. 2014. *Phlebotomus sergenti* a common vector of *Leishmania tropica* and Toscana virus in Morocco. *Journal of Vector Borne Diseases*, 51(2), 86–90.
- Favret C. 2005. A new non-destructive DNA extraction and specimen clearing technique for aphids (Hemiptera). *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 107(2), 469–470.
- Galati EAB. 2018. Phlebotominae (Diptera, Psychodidae): Classification, morphology and terminology of adults and identification of American taxa, in *Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control*, Rangel EF, Shaw JJ, Editors. Cham: Springer International Publishing. pp. 9–212.
- Galati EAB, de Andrade AJ, Perveen F, Loyer M, Vongphayloth K, Randrianambinintsoa FJ, Prudhomme J, Rahola N, Akhoundi M, Shimabukuro PHF, Depaquit J. 2025. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) of the world. *Parasites & Vectors*, 18(1), 220.
- Galati EAB, Galvis-Ovallos F, Lawyer P, Leger N, Depaquit J. 2017. An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24, 26.
- Garipey T, Kuhlmann U, Gillott C, Erlandson M. 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *Journal of Applied Entomology*, 131(4), 225–240.
- Giantsis IA, Chaskopoulou A, Bon MC. 2016. Mild-Vectolysis: A nondestructive DNA extraction method for vouchering sand flies and mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 53(3), 692–695.
- Gidwani K, Picado A, Rijal S, Singh SP, Roy L, Volfova V, Andersen EW, Uranw S, Ostyn B, Sudarshan M, Chakravarty J, Volf P, Sundar S, Boelaert M, Rogers ME. 2011. Serological

- markers of sand fly exposure to evaluate insecticidal nets against visceral leishmaniasis in India and Nepal: a cluster-randomized trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), e1296.
26. Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M. 2007. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One*, 2(3), e272.
  27. Giordani BF, Andrade AJ, Galati EAB, Gurgel-Goncalves R. 2017. The role of wing geometric morphometrics in the identification of sandflies within the subgenus *Lutzomyia*. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(4), 373–380.
  28. Guzmán-Larralde AJ, Suaste-Dzul AP, Gallou A, Peña-Carrillo KI. 2017. DNA recovery from microhymenoptera using six non-destructive methodologies with considerations for subsequent preparation of museum slides. *Genome*, 60(1), 85–91.
  29. Hajibabaei M, DeWaard JR, Ivanova NV, Ratnasingham S, Dooh RT, Kirk SL, Mackie PM, Hebert PD. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1959–1967.
  30. Haouas N, Pesson B, Boudabous R, Dedet JP, Babba H, Ravel C. 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(6), 1054–1059.
  31. Hlavackova K, Dvorak V, Chaskopoulou A, Volf P, Halada P. 2019. A novel MALDI-TOF MS-based method for blood meal identification in insect vectors: A proof of concept study on phlebotomine sand flies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(9), e0007669.
  32. Huemer H, Prudhomme J, Amaro F, Baklouti A, Walder G, Alten B, Moutailler S, Ergunay K, Charrel RN, Ayhan N. 2017. Practical guidelines for studies on sandfly-borne phleboviruses: Part II: Important points to consider for fieldwork and subsequent virological screening. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 81–90.
  33. Jancarova M, Polanska N, Thiesson A, Arnaud F, Stejskalova M, Rehbergerova M, Kohl A, Viginier B, Volf P, Ratniner M. 2025. Susceptibility of diverse sand fly species to Toscana virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 19(5), e0013031.
  34. Kapp JD, Green RE, Shapiro B. 2021. A fast and efficient single-stranded genomic library preparation method optimized for ancient DNA. *Journal of Heredity*, 112(3), 241–249.
  35. Killick-Kendrick R, Maroli M, Killick-Kendrick M. 1991. Bibliography of the colonization of phlebotomine sandflies. *Parassitologia*, 33(suppl.), 321–333.
  36. Lawyer P, Killick-Kendrick M, Rowland T, Rowton E, Volf P. 2017. Laboratory colonization and mass rearing of phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 24, 42.
  37. Léger N, Pesson B, Madulo-Leblond G. 1986. Les phlébotomes de Grèce : 1ère partie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 79, 386–397.
  38. Léger N, Pesson B, Madulo-Leblond G. 1986. Les phlébotomes de Grèce : 2ème partie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 79, 514–524.
  39. Leonel JAF, Vioti G, Alves ML, da Silva DT, Meneghesso PA, Benassi JC, Spada JCP, Galvis-Ovallos F, Soares RM, Oliveira T. 2020. DNA extraction from individual Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) specimens: Which is the method with better results? *Experimental Parasitology*, 218, 107981.
  40. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. 2017. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005600.
  41. Lienhard A, Schaffer S. 2019. Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ*, 7, e6753.
  42. Lozano-Sardaneta YN, Mikery-Pacheco OF, Huerta H, Rojas-Soriano JE, Contreras-Ramos A. 2025. Wing geometric morphometrics is effective to separate sand fly species (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) related with leishmaniasis transmission in Mexico. *Acta Tropica*, 262, 107523.
  43. Mandrioli M. 2008. Insect collections and DNA analyses: how to manage collections? *Museum Management and Curatorship*, 23(2), 193–199.
  44. Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147.
  45. Marquina D, Buczek M, Ronquist F, Lukasik P. 2021. The effect of ethanol concentration on the morphological and molecular preservation of insects for biodiversity studies. *PeerJ*, 9, e10799.
  46. Mathis A, Depaquit J, Dvorak V, Tuten H, Banuls AL, Halada P, Zapata S, Lehrter V, Hlavackova K, Prudhomme J, Volf P, Sereno D, Kaufmann C, Pflugger V, Schaffner F. 2015. Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems. *Parasites & Vectors*, 8, 266.
  47. Mekarnia N, Benallal KE, Sadlova J, Vojtkova B, Mauraas A, Imbert N, Longhitano M, Harrat Z, Volf P, Loiseau PM, Cojean S. 2024. Effect of *Phlebotomus papatasi* on the fitness, infectivity and antimony-resistance phenotype of antimony-resistant *Leishmania* major Mon-25. *International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance*, 25, 100554.
  48. Milligan BG. 1998. Total DNA isolation, in *Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach*, Hoelzel AR, Editor. Oxford: Oxford University Press.
  49. Molina R, Jiménez M, Alvar J, González E, Hernández-Taberna S, Ines MM. 2017. *Methods in sand fly research*. Madrid: Servicio de publicaciones Universidad de Alcalá de Henares, Madrid.
  50. Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS. 2001. Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics. *Science*, 294(5550), 2348–2351.
  51. Nacif-Pimenta R, Pinto LC, Volfova V, Volf P, Pimenta PFP, Secundino NFC. 2020. Conserved and distinct morphological aspects of the salivary glands of sand fly vectors of leishmaniasis: an anatomical and ultrastructural study. *Parasites & Vectors*, 13(1), 441.
  52. Neuhaus B, Schmid T, Riedel J. 2017. Collection management and study of microscope slides: Storage, profiling, deterioration, restoration procedures, and general recommendations. *Zootaxa*, 4322(1), 1–173.
  53. New TR. 1974. *Pscoptera. Handbooks for Identification of British Insects (Vol. I)*. London: Royal Entomological Society of London. 102 pp.
  54. Perez-Ruiz M, Collao X, Navarro-Mari JM, Tenorio A. 2007. Reverse transcription, real-time PCR assay for detection of Toscana virus. *Journal of Clinical Virology*, 39(4), 276–281.
  55. Porco D, Rougerie R, Deharveng L, Hebert P. 2010. Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small

- soft-bodied Arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology Resources*, 10(6), 942–945.
56. Prudhomme J, Cassan C, Hide M, Toty C, Rahola N, Vergnes B, Dujardin JP, Alten B, Sereno D, Banuls AL. 2016. Ecology and morphological variations in wings of *Phlebotomus ariasi* (Diptera: Psychodidae) in the region of Roquedur (Gard, France): a geometric morphometrics approach. *Parasites & Vectors*, 9(1), 578.
  57. Prudhomme J, Gunay F, Rahola N, Ouanaïmi F, Guernaoui S, Boumezzough A, Banuls AL, Sereno D, Alten B. 2012. Wing size and shape variation of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) populations from the south and north slopes of the Atlas Mountains in Morocco. *Journal of Vector Ecology*, 37(1), 137–147.
  58. Prudhomme J, Toty C, Kasap OE, Rahola N, Vergnes B, Maia C, Campino L, Antoniou M, Jimenez M, Molina R, Cannet A, Alten B, Sereno D, Banuls AL. 2015. New microsatellite markers for multi-scale genetic studies on *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, vector of *Leishmania infantum* in the Mediterranean area. *Acta Tropica*, 142, 79–85.
  59. Prudhomme J, Velo E, Bino S, Kadriaj P, Mersini K, Gunay F, Alten B. 2019. Altitudinal variations in wing morphology of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in Albania, the region where it was first recorded in Europe. *Parasite*, 26, 55.
  60. Rawlins DJ. 1992. *Light Microscopy: An Introduction to Biotechniques*. Oxford: Bios Scientific publishers. 143 pp.
  61. Ready PD. 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227–250.
  62. Rohlf FJ, Slice D. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), 40–59.
  63. Rowley DL, Coddington JA, Gates MW, Norrbom AL, Ochoa RA, Vandenberg NJ, Greenstone MH. 2007. Vouchering DNA-barcoded specimens: Test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 915–924.
  64. Sábio PB, Andrade AJ, Galati EAB. 2014. Assessment of the taxonomic status of some species included in the *Shannoni* complex, with the description of a new species of *Psathyromyia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Journal of Medical Entomology*, 51(2), 331–341.
  65. Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, Miles MA. 2011. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One*, 6(5), e19851.
  66. Sales K, Miranda DEO, da Silva FJ, Otranto D, Figueredo LA, Dantas-Torres F. 2020. Evaluation of different storage times and preservation methods on phlebotomine sand fly DNA concentration and purity. *Parasites & Vectors*, 13(1), 399.
  67. Sales KG, Costa PL, de Moraes RC, Otranto D, Brandao-Filho SP, Cavalcanti Mde P, Dantas-Torres F. 2015. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. *Parasites & Vectors*, 8, 230.
  68. Sant'Anna MR, Jones NG, Hindley JA, Mendes-Sousa AF, Dillon RJ, Cavalcante RR, Alexander B, Bates PA. 2008. Blood meal identification and parasite detection in laboratory-fed and field-captured *Lutzomyia longipalpis* by PCR using FTA databasing paper. *Acta Tropica*, 107(3), 230–237.
  69. Senne NA, Santos HA, Araujo TR, Paulino PG, Mendonca LP, Moreira HVS, Camilo TA, da Costa Angelo I. 2022. Robust comparative performance of genomic DNA extraction methods from non-engorged phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 36(2), 203–211.
  70. Shaw JJ. 2025. A review of *Leishmania* infections in American Phlebotomine sand flies – Are those that transmit leishmaniasis anthropophilic or anthroopportunist? *Parasite*, 32, 57.
  71. Tesh RB, Modi GB. 1983. Growth and transovarial transmission of Chandipura virus (Rhabdoviridae: Vesiculovirus) in *Phlebotomus papatasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32(3), 621–623.
  72. Thomsen PF, Elias S, Gilbert MTP, Haile J, Munch K, Kuzmina S, Froese DG, Sher A, Holdaway RN, Willerslev E. 2009. Non-destructive sampling of ancient insect DNA. *PLoS One*, 4(4), e5048.
  73. Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML. 2000. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29(1), 52–54.
  74. Upton MS. 1993. Aqueous gum-chloral slide mounting media: an historical review. *Bulletin of Entomological Research*, 83(2), 267–274.
  75. Volf P, Myskova J. 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends in Parasitology*, 23(3), 91–92.
  76. Wang Q, Wang X. 2012. Comparison of methods for DNA extraction from a single chironomid for PCR analysis. *Pakistan Journal of Zoology*, 44(2), 421–426.
  77. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. 2021. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nature Biotechnology*, 39(11), 1348–1365.

**Cite this article as:** Randrianambinintsoa FJ, Augendre L, Prudhomme J, Martinet J-P, Loyer M, Mekamia 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, Gouzou 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, Suleşco 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: Jean-Lou Justine, Paris Submit your manuscript at: <https://www.editorialmanager.com/parasite>

**ឧបសម្ព័ន្ធទី១: មូលដ្ឋានគ្រឹះវិទ្យាសាស្ត្រជីវគីមី (Appendix 1: Biochemical theoretical foundations)**

**Phlebotomine (sand flies)**

គឺជាក្រុមដែលពាក់ព័ន្ធនឹង **arthropods** ។  
ទោះបីជាយ៉ាងណា  
គំនិតទូទៅនេះអាចពង្រីកទៅកាន់ **arthropods** មានដើង  
ផ្សេងទៀតដែលមានភាពទូទៅខ្លាំង  
ហើយការកំណត់អត្តសញ្ញាណអាចធ្វើបានតាមលក្ខណៈរាង  
កាយខាងក្នុងតែប៉ុណ្ណោះ។ ដោយចែងនូវ  
សរីរាងខាងក្នុងខ្លះមានសភាពជា **chitinised**  
និងលក្ខណៈរូបរាងរបស់វាបង្ហាញពីមានមានតម្លៃ។  
នេះជាហេតុផលដែលការពិនិត្យបំពង់អាហារ (**food pumps**), **ថង់ផ្កកទឹកកាមញី (spermathecae)**  
និងបំពង់ទឹករបស់វា គឺមានចំណាប់អារម្មណ៍ខ្លាំង។  
ជាមួយនឹងប្រតិករ  
ទាំងអស់ដែលយើងនឹងពិនិត្យឡើងវិញ  
វាមិនត្រូវបានបំភ្លេចឡើយថា ចាប់ពីដំណាក់កាលនៃ  
insect fixation រហូតដល់ការដំឡើង (assembly)  
យើងនឹងអនុវត្តប្រតិកម្មអុកស៊ីតកម្ម-វិដុកស៊ីតកម្ម

(redox reactions) យ៉ាងសាមញ្ញ។ ការប្រុងប្រយ័ត្ន  
ឬគំនិតតែមួយគត់ដែលនឹងនាំយើងគឺ  
ការជៀសវាងលាយសារធាតុប្រតិកម្មកាត់បន្ថយ  
(reducing reagents)  
ជាមួយសារធាតុប្រតិកម្មអុកស៊ីតកម្ម (oxidizing  
reagents)។  
**Ethyl alcohol; ethanol:**  
សារធាតុនេះនឹងត្រូវបានប្រើប្រាស់តាមវិធីផ្សេងៗគ្នា។  
ម៉ូលេគុលអាល់កុលមានទំនាក់ទំនងខ្លាំងជាមួយទឹក  
ហើយដូច្នេះវាបង្ហាញពីឥទ្ធិពលខ្សោះជាតិទឹក  
(dehydrating effect)។ ទោះយ៉ាងណា  
អាល់កុលដែលមានកំហាប់ទាប (ឧ. សម្បូរទឹកពេក)  
នឹងដើរតួក្នុងការបំបែកអាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីក (degradation  
of nucleic acids)  
(ទឹកគឺជាសត្រូវរបស់អាស៊ីតនុយក្លេអ៊ីក)។

នៅពេលដែលសត្វល្អិតត្រូវបានដាក់ក្នុងអេតាណុល  
វាមិនមែនគ្រាន់តែដើម្បីរក្សាទុក (preserve) វាប៉ុណ្ណោះទេ  
ប៉ុន្តែថែមទាំងដើម្បីជួសជុល (fix) ជាលិកាទៀតផង។  
ក្នុងជាលិកាសាស្ត្រ (histology)  
ជាធម្មតាយើងបែងចែកគោលគំនិតសំខាន់ពីរគឺ:

អត្រាជ្រាបចូល (penetration rate) និង fixation rate។ គេយល់យ៉ាងច្បាស់ថា សារធាតុថែរក្សាដ៏ល្អ (good preservative) ត្រូវតែជ្រាបចូលយ៉ាងលឿនទៅក្នុងជាលិកាមុនពេល fixation។ សម្រាប់អាល់កុល ៩៦% មេគុណនៃការជ្រាបចូល (penetration coefficient) គឺប្រហែល ១.០៥ (ប្រៀបធៀបទៅនឹងសូលុយស្យុងអាត្រាសនៃអាស៊ីតភីករិច (picric acid) ០.៧៥% មេគុណនៃការជ្រាបចូលគឺ ០.៤៥ វិធានសូលុយស្យុងប៉ូតាស្យូមឌីក្រូមេត (potassium dichromate) ៣% វិញ មេគុណគឺ ១.៤៥)។

ការចង់រក្សាទុកសត្វល្អិត និង arthropods ដទៃទៀតក្នុងអេតាណុលដោយគ្មានកំណត់ពេល (indefinitely) គឺជាការពិបាកសម្រាប់អ្នកជំនាញខាងសត្វល្អិត (entomologists)។ គំនិតដែលចង់រក្សាទុកសំណាកដែលចាប់បានពី field (field captures) សម្រាប់ការសិក្សាជាបន្តបន្ទាប់ ឬសម្រាប់អ្នកស្រាវជ្រាវនាពេលអនាគត គឺនៅតែគួរឱ្យគោរពណាស់។ ទោះជាយ៉ាងណា គំនិតនេះមិនអាចទៅរួចទេសម្រាប់អ្នកជំនាញខាងកោសិកាវិទ្យា (cytologist) ឬជីវវិទូជាលិកា (histologist)។ តាមរយៈការទុកសំណាកក្នុងសារធាតុ fixative យូរពេក វាអាចក្លាយទៅជាមិនអាចធ្វើការឡើងវិញបាន (practically impossible to rework)។ នេះហើយជាមូលហេតុដែលសំណាកដែលចាស់ជាង ១០ ឆ្នាំ ពិបាក ឬសូម្បីតែមិនអាចប្រើប្រាស់បាន។

ការពិចារណាមួយទៀតគឺ សមាមាត្រ (ratio) រវាងម៉ាស់ arthropods ដែលត្រូវជួសជុល និងបរិមាណនៃសារធាតុជួសជុល (fixator)។ ក្នុងការអនុវត្តផ្នែកសត្វវិទ្យា (zoological) ឬវេជ្ជសាស្ត្រ (medical) គេត្រូវតែរៀបចំបរិមាណជំជាង ៦០

ដងនៃបរិមាណបំណែកដែលត្រូវជួសជុល។ ក្នុងការអនុវត្ត សម្រាប់មីក្រូ-arthropods (micro-arthropods) សម្រាប់បរិមាណជាក់លាក់នៃសំណាកដែលត្រូវជួសជុល ត្រូវបន្ថែមអាល់កុលយ៉ាងហោចណាស់ ៤-៥ ដងនៃបរិមាណនោះ។ ត្រូវចងចាំថា អាល់កុលនឹងបាត់បង់កម្លាំង (strength) របស់វា នៅពេលដែលវាយកទឹកទាំងអស់ដែលមាននៅក្នុងជាលិកា របស់ arthropods ចេញ។

**សរុបសេចក្តី:**

- អេទីលអាល់កុល គឺជាភ្នាក់ងារគីមីកាត់បន្ថយ (reducing chemical agent) (ដូច្នេះវាមិនធានាជាមួយសារធាតុជួសជុលបែប អុកស៊ីតកម្ម (oxidative fixatives));
- វាធ្វើឱ្យប្រូតេអ៊ីន precipitate យ៉ាងខ្លាំងក្លា និងធ្វើឱ្យខូចទ្រង់ទ្រាយ (denatures) ពួកវា;
- វាវាយ (dissolves) លីពីតស្លុកស្លាញ (complex lipids) មួយចំនួន និងធ្វើឱ្យ glycogen precipitate;
- វាបណ្តាលឱ្យមានការកម្រិតខ្លាំង (strong contraction) នៃជាលិកា និងធ្វើឱ្យពួកវាវឹង (hardens)។

**សូលុយស្យុងប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត ឬ សូដ្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត :**

ការប្រើប្រាស់សូលុយស្យុងទាំងនេះក្នុងវិទ្យាសាស្ត្រនៃការសិក្សាសត្វល្អិត (Entomology) ភាគច្រើនផ្តោតលើប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត ដោយគ្មានបញ្ជាក់ពីមូលហេតុច្បាស់លាស់។

សូដ្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត [E524]: មាននៅក្នុងសូលុយស្យុងទាំងក្នុងកម្រិតកំហាប់ផ្សេងៗគ្នា ឬជាមួយនឹងសភាព (Normality) ផ្សេងគ្នា។ វាមានទម្រង់ជាគ្រាប់តូចៗ (Pellets) ឬជាផ្ទាំងភ្លឺចាំង (Glitter)។ គុណវិបត្តិចម្បងរបស់វាគឺថា

វាស្រូបយកសំណើមបានយ៉ាងខ្លាំង (Hygroscopic) (ច្រើនជាង KOH)។ នៅពេលវាប្រតិកម្មជាមួយប្រូតេអ៊ីន វារំលាយពួកវា ហើយជាមួយលីពីត (Lipids) វាបំប្លែងពួកវាទៅជាសាប៊ូរឹង (Hard Soaps) កំឡុងពេលប្រតិកម្មសាបូកម្ម (Saponification) (នេះគឺជាភាពខុសគ្នាដ៏ធំមួយពី KOH ដែលបង្កើតសាប៊ូរាវ (Liquid Soaps) កំឡុងពេលប្រតិកម្មសាបូកម្ម)។

**ប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត [E525]:**

មានលក់ជាសូលុយស្យុងកំហាប់ខ្ពស់ (Concentrated Solution) ប៉ុន្តែសំខាន់ជាងនេះទៅទៀត វាមានគុណសម្បត្តិដែលត្រូវបានផលិតជាទម្រង់គ្រាប់តូចៗ (Pellets) ប្រហែល ០.១ ក្រាម ដែលជួយសម្រួលយ៉ាងខ្លាំងដល់ការរៀបចំសូលុយស្យុងរំលាយ (Diluted Solutions) នៅពេលដែលគ្មានជញ្ជីងថ្លឹងភាពជាក់លាក់ (Precision Balance)។ ឧទាហរណ៍ គ្រាប់ ១ គ្រាប់ទម្ងន់ ០.១ ក្រាម ក្នុងទឹកបិក១ មីលីលីត្រ ផ្តល់សូលុយស្យុង ១០%។ គុណសម្បត្តិទីពីរនៃប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីតគឺជាគ្រាប់គី ភាពរលីបតិចជាងចំពោះការកាបូណាតនីយកម្ម (Carbonation) (សូលុយស្យុង KOH មានទំនាក់ទំនងខ្ពស់ក្នុងការចាប់យក CO2 ដោយហេតុនោះបង្កើតអំបិលកាបូណាត)។

**ការប្រើប្រាស់:**

**Strong Bases**

ទាំងនេះនឹងត្រូវបានប្រើដើម្បីរំលាយអាស៊ីតខ្លាញ់ (Fatty Acids) ដោយបំប្លែងពួកវាទៅជាសាប៊ូដែលរលាយក្នុងទឹក (Water-soluble Soaps)។ ក្នុងរំលឹកថា សារធាតុរក្សារូប (Fixative) ដូចជា អេតាណុល (Ethanol) បានរំលាយខ្លាញ់មួយចំនួននៅក្នុងសំណាករួចហើយ។ ទោះជាយ៉ាងណាក៏ដោយ តាមរយៈការជំនួសសំណាកនៅក្នុងឧបករណ៍ផ្តុកអាគុយ

(Aqueous Medium) ជាមួយនឹងមូលដ្ឋានរឹងមាំ អាស៊ីតខ្លាញ់ (ដែលមានលក្ខណៈស្លុតស្តាយច្រើន ឬតិច) នឹងធ្លាក់ជាដីល្បាប់ (Precipitate)។ ដូច្នោះ មូលដ្ឋានរឹងមាំនឹងធ្វើសាប៊ូនីយកម្មនៅសីតុណ្ហភាពត្រជាក់ (Cold Saponification)។ ក្នុងករណីខ្លះ នៅពេលដែលជាលិកាខ្លាញ់ (Adipose Tissues) លើសឧទាហរណ៍នៅក្នុងញី វានឹងមានអត្ថប្រយោជន៍ក្នុងការបង្កើនសីតុណ្ហភាពដល់ ៣៥-៤០អង្សាសេ ដើម្បីជួយសម្រួលដល់ប្រតិកម្ម ឬក៏បង្កើនពេលវេលាប៉ះពាល់ (Contact Time) នៅសីតុណ្ហភាពបន្តិច។

**សូលុយស្យុងម៉ាក-អង់ដ្រេ (Marc-André Solution) ពណ៌/គ្មានពណ៌:**

នៅទីនេះ យើងនឹងស្វែងយល់ពីគុណសម្បត្តិ និងគុណវិបត្តិនៃការប្រើប្រាស់សូលុយស្យុងម៉ាក-អង់ដ្រេ។ សូលុយស្យុងនេះផ្សំឡើងពីក្លរ៉ាល់ អ៊ីដ្រាត (Chloral Hydrate) (ទ្រីក្លរ៉ាអាសេតាល់ដេអ៊ីត ម៉ូណូអ៊ីដ្រាត - Trichloroacetaldehyde Monohydrate), អាស៊ីតអាសេទិក (Acetic Acid), និងទឹក។ សូលុយស្យុងនេះមានលក្ខណៈជាអុកស៊ីតកម្មខ្លាំង (Very Oxidizing) (ល្បាយនៃអាស៊ីត និងអាត់ដេអ៊ីត)។ វានឹងបន្ស្រាប (Neutralize) ប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីតដែលលើសដែលអាចនៅសេសសល់ក្នុងសំណាក (Samples) ដោយមិនធ្វើឱ្យសាប៊ូអាល់កាឡាំង (Alkaline Soaps) ដែលបង្កើតឡើងអំឡុងពេលប្រើប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត ធ្លាក់ជាដីល្បាប់ (Precipitating) ឡើយ។

សូលុយស្យុងអុកស៊ីតកម្មនេះក៏នឹងមានសកម្មភាពលើមុខ ងារជាតិអាល់កុលបន្ទាប់បន្សំ (Secondary Alcohol Functions) នៃក្លុយកូសាមីន (Glucosamines) ដែលបង្កើតជាឈីទីន (Chitin) ដោយធ្វើអុកស៊ីតកម្មពួកវា ដែលធ្វើឱ្យឈីទីនទន់ (Softening)។

សកម្មភាពមួយទៀតគឺការរំលាយ (Dissolution) អំបិលរ៉ែ (Mineral Salts) មួយចំនួនដែលមានវត្តមាន។

នៅពេលដែលសូលុយស្យុងម៉ាក-អង់ដ្រេត្រូវបានធ្វើឲ្យមានពណ៌ពីមុនដោយអាស៊ីតហ្វូស៊ីន (Acid Fuchsin) (ដូច្នេះវាស្ថិតក្នុងស្ថានភាពអុកស៊ីតកម្ម) វានឹងអាចភ្ជាប់ (Fix) ទៅលើមុខងារជាតិអាណូនបន្ទាប់បន្សំនៃរចនាសម្ព័ន្ធ បាន។ បន្ទាប់ពីរយៈពេលប៉ះពាល់ (Contact Time) នៃសូលុយស្យុងម៉ាក-អង់ដ្រេ និងស្ថានភាពនៃការធ្វើឲ្យមានស្នាមប្រឡាក់ (Staining State) នៃសំណាករួច ការលាងសម្អាត (Rinsing) នឹងធ្វើឡើងដោយប្រើអេតាណុល (Ethanol) តែប៉ុណ្ណោះ។ ដូចនេះ យើងចាប់ផ្តើមដំណាក់កាលខ្សោះជាតិទឹក (Dehydration Phase) នៃសំណាក។ អត្ថប្រយោជន៍ (Benefits): បន្សាប (Neutralization) នូវសូលុយស្យុងមូលដ្ឋាន (Basic Solutions) ដែលលើសធ្វើឲ្យឈឺទឹក (Chitin) ទន់ (Relaxation) ធ្វើឲ្យឈឺទឹកមានស្នាមប្រឡាក់ (Staining) ដើម្បីវាយកម្តៅរចនាសម្ព័ន្ធខាងក្នុងដែលមានជាតិឈឺទឹក (Chitinized Internal Structures) បានកាន់តែប្រសើរគុណវិបត្តិ (Drawbacks):

ក្លរ៉ាល់ អ៊ីដ្រាត (Chloral Hydrate) គឺជាថ្នាំដង្កុយគេង (Hypnotic) ហើយធ្លាប់ត្រូវបានប្រើប្រាស់ក្នុងវេជ្ជសាស្ត្រមនុស្ស។ វាត្រូវតែប្រើក្រោមការត្រួតពិនិត្យបច្ច័យគីមី (Chemical Hood) ហើយត្រូវតែអនុវត្តតាមច្បាប់ស្តីពីហានិភ័យគីមី (Chemical Risks)។ សូលុយស្យុងសម្រាប់ខ្សោះជាតិទឹក (Dehydration Solutions)៖

បទពិសោធន៍បង្ហាញថា សម្រាប់សំណាកតូចៗបំផុត (Very Small Samples) វាមិនចាំបាច់ធ្វើតាមលំដាប់នៃការដុតអាណូន (Alcohol Baths)

ដែលមានកម្រិតកំហាប់កើនឡើងដល់ដប់នោះទេ។ ប្រសិនបើសំណាកមានទំហំធំ (Large) យើងនឹងចាប់ផ្តើមជាមួយអេតាណុល ៨០% បន្ទាប់មក ៩០%, ៩៥% និងចុងក្រោយអេតាណុលដាច់ខាត (Absolute Ethanol)។ សម្រាប់សំណាកតូចៗបំផុត សូមប្រើការដុតជាមួយអេតាណុល ៩០% បន្ទាប់មកដោយការជ្រលក់ (Immersion) ក្នុងអេតាណុលដាច់ខាត។ នៅដំណាក់កាលនេះ យើងត្រូវចងចាំជានិច្ចថា អេតាណុលដាច់ខាត ស្វែងរកចាប់យក (Fix) ទឹកនៅក្នុងបរិយាកាស។

ប្រពៃណីនៅក្នុងមន្ទីរពិសោធន៍កសិករវិទ្យា (Entomology Laboratories) គឺការបញ្ចប់ការខ្សោះជាតិទឹកនៃសំណាកជាមួយនឹងការដុត ក្រូសូត (Creosote) ពីដើមប៊ិច (Beech)។ សព្វថ្ងៃនេះ ប្រេងសំខាន់ (Essence) នេះ ដែលត្រូវបានគេប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយជាថ្នាំសម្លាប់សត្វល្អិត (Pesticide), ថ្នាំប្រឆាំងផ្សិត (Antifungal), និងសារធាតុថែរក្សាលើ (Wood Preservative) ត្រូវបានគេបង្អាក់ការប្រើប្រាស់យ៉ាងខ្លាំង ដោយសារតែគ្លីនិករបស់វា (អ៊ីដ្រូកាបូនក្រអូបពហុស៊ីក្លូ - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) ហើយវាត្រូវបានគេសន្មតថាជាសារធាតុពុលបន្តពូជ (Reprotoxic), បង្កមហារីក (Carcinogenic), សារធាតុឆ្លងមេរោគពិខាងក្រៅសរីរាង្គរលាយបានយូរ (Persistent Organic Pollutant), និងពុលដល់ប្រព័ន្ធអេកូឡូស៊ី (Ecotoxic) សម្រាប់សារពាង្គកាយក្នុងទឹក (Aquatic Organisms)។

សូលុយស្យុងមួយដែលយើងស្នើឡើងដើម្បីរៀបចំសម្រាប់ការ រំmounting (Mounting) សំណាកគឺ អឺប៉ារ៉ាល់ (Euparal®) និងប្រេងសំខាន់អឺប៉ារ៉ាល់ (Euparal Essence) (បានពិពណ៌នាក្នុងកថាខណ្ឌបន្ទាប់)។ ល្បាយនៃអឺប៉ារ៉ាល់ (Euparal®) និងប្រេងសំខាន់អឺប៉ារ៉ាល់

ត្រូវបានគេទទួលយកបានយ៉ាងល្អ។  
សំណាកត្រូវបានគេយកមកប្រើបន្ទាប់ពីការដុតអេតាណុល ៩០%។

**ឧបសម្ព័ន្ធទី ២៖ សមាសភាពនៃសារធាតុប្រតិករ (Reagents) ដែលបានប្រើប្រាស់**

**ប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត ១០% (Potassium Hydroxide 10%)**

ប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត ១០ ក្រាម  
ទឹកបិទ(Distilled Water) បន្ថែមរហូតដល់ (q.s.) ១០០ មីលីលីត្រ

**Mounting Medium Hoyer Medium (Gum Chloral)**

ទឹកបិទ៥០ មីលីលីត្រ  
Chloral Hydrate ២០០ ក្រាម  
Gum Arabic ៥០ ក្រាម  
Glycerol ២០ មីលីលីត្រ

**សូលុយស្យុង ម៉ាក-អង់ដ្រេ (Marc-André Solution)**

ក្លរ៉ាវ៉ាល់ អ៊ីដ្រាត ៤០ ក្រាម  
អាស៊ីតអាសេទិក កក (Glacial Acetic Acid) ៣០ មីលីលីត្រ  
ទឹកបិទ៣០ មីលីលីត្រ

**អាស៊ីតហ្វូស៊ីន (Fuchsin Acid) ១% ក្នុងទឹកចម្រោះ**

ម្សៅអាស៊ីតហ្វូស៊ីន (Acid Fuchsin Powder) ១ ក្រាម  
ទឹកបិទ៩៩ មីលីលីត្រ

**សូលុយស្យុង ម៉ាក-អង់ដ្រេ មានពណ៌ដោយហ្វូស៊ីន (Marc-André Solution Colored with Fuchsin)**

សូលុយស្យុង ម៉ាក-អង់ដ្រេ ១០ មីលីលីត្រ  
ហ្វូស៊ីន ១% ៥០ មីលីលីត្រ (μL)

**ឧបសម្ព័ន្ធទី ៣៖ អ៊ីប៉ារ៉ាល់ (Euparal®), Canada Balsam, Polyvinyl Alcohol ឬសូលុយស្យុងផ្សេងទៀតសម្រាប់ mounting**

**Polyvinyl Alcohol:** នេះគឺជាMounting Medium ដ៏ល្អនៅពេលដែលផលិតផលចាំបាច់សម្រាប់ការខ្សោះជាតិទឹក (Dehydration) ត្រឹមត្រូវមិនអាចរកបាន។ Polyvinyl Alcohol ត្រូវបានលាយជាមួយ ឡាក់តូហ្វេណុល (Lactophenol) របស់អាម៉ាន់ (Amman)។ ទោះជាយ៉ាងណាក៏ដោយ ការផ្គុំ (Assemblies) ទាំងនេះបង្ហាញពីគុណវិបត្តិចម្បងគឺ រួញរឹង (Drying Out) ឬPolyvinyl Alcohol បង្កើតជាគ្រីស្តាល់ (Crystallizes) ដោយសារការហួតទឹក (Water Evaporation) ឬប្រែជាខ្មៅ (Blackening) នៅពេលហ្វេណុល (Phenol) ធ្វើអុកស៊ីតកម្ម (Oxidizes)។ នេះនៅតែជាបច្ចេកទេសដ៏ល្អសម្រាប់ការmountingរយៈពេលខ្លី (Short-term Mounting)។

**Canada Balsam:** ការប្រើប្រាស់របស់វាសម្រាប់mounting (Mounting) នៅចន្លោះស្លាយ (Slide) និងគម្របស្លាយ (ឡាក់តូហ្វេណុល) តម្រូវឱ្យមានការខ្សោះជាតិទឹក (Dehydration) នៃសំណាក (Samples) ដែលត្រូវmounting។ ការប្រើប្រាស់ស៊ីលីន (Xylene) ឬ តូលូអ៊ីន (Toluene) គឺមិនមែនគ្មានការលំបាក (Inconvenience) នោះទេ។

**Enecê Medium:** សម្រាប់mountingនៅចន្លោះស្លាយ និងគម្របស្លាយ ដូចជាCanada Balsamដែរ វាតម្រូវឱ្យមានការខ្សោះជាតិទឹកនៃសំណាក (Specimen)។ រូបមន្តEnecê Formulation: កូឡូហ្វូនីសុទ្ធពណ៌ស (Pure White Colophony) (២២ ក្រាម); Alcohol-soluble Copal

Gum (១២ ក្រាម), អាល់កុលសុទ្ធ (Absolute Alcohol) (២០ មីលីលីត្រ), កាហ្គួរ (Camphor) (១០ ក្រាម), ប្រេងសំខាន់គួររំលាយ (Turpentine Essence) (១០ មីលីលីត្រ), និង Eucalyptol (២៦ មីលីលីត្រ)។ សម្រាប់ការរៀបចំរបស់វា នៅក្នុងធុងមួយ ដូចជា ដបកោណអែរឡីនម៉ែ (Erlenmeyer Flask) ដាក់អាល់កុលសុទ្ធ និងកាហ្គួរ។ បន្ទាប់មកបន្ថែមកូឡូឡូនី និងស្ករកៅស៊ូក្នុងចំណុះ បន្ទាប់មក ដបត្រូវបានបិទដោយក្បាលឈប់ (Stopper) និងអង្រួន (Shaken) ហើយទើបតែយកទៅកម្ដៅក្នុងអាងទឹកក្ដៅ (Bain-marie) នៅសីតុណ្ហភាពស្រាល (Gentle Temperature) ដើម្បីកុំឱ្យល្អាយពុះ (Boil)។ នៅពេលដែលមាតិកាឈាមរាវទាំងស្រុង (Completely Liquefied) រួច បន្ថែមប្រេងសំខាន់គួររំលាយ (Filtered) បន្ទាប់មកចម្រោះ (Filtered) ខណៈពេលដែលល្អាយនៅក្ដៅ (Hot) ហើយចុងក្រោយបន្ថែមអីកាលីបតូលទៅក្នុងសារធាតុរាវ ដែលចម្រោះរួច (Filtrate)។ នៅពេលដែលឧបករណ៍ផ្ទុក (Medium) ក្លាយទៅជាវាស់តិច (Less Fluid) គេរំលាយ (Diluted) វាជាមួយ អេណេក (Eenecé) ដែលមានរូបមន្តដូចខាងក្រោម៖ អាល់កុលសុទ្ធ (៣០ មីលីលីត្រ), កាហ្គួរ (១៧ ក្រាម), ប្រេងសំខាន់គួររំលាយ (១៥ មីលីលីត្រ), អីកាលីបតូល (៣៨ មីលីលីត្រ) (ស៊ែរកេរ៉ា, ១៩៤៣ - Cerqueira, 1943)។

**អីដាវ៉ាល់ (Euparal®)៖** នេះគឺជាជ័រ (Resin) ដែលមកពីCypress of the Atlas ប្រភេទ *Tetraclinis articulata*(វ៉ាល់, ១៧៩១ - Vahl, 1791) ហើយត្រូវបានសិក្សា និងបង្កើតឡើងក្នុងឆ្នាំ ១៩០៦ ដោយGilson។ គុណសម្បត្តិចម្បងរបស់វាគឺថា វាមិនធ្វើប៉ូលីមែរនីយកម្ម (Polymerize) ទេ។ សំណាក (Samples) ដែលបានmountingនៅចន្លោះស្លាយ និងកម្របស្លាយ អាចត្រូវបានយកមកវិញ (Recovered)

យ៉ាងងាយស្រួលដោយសកម្មភាពនៃជាតិអាល់កុល ឬល្អជាងនេះទៅទៀតគឺប្រេងសំខាន់អីដាវ៉ាល់ (Euparal® Essence)។ ជ័រនេះ ដែលត្រូវបានគេហៅម្យ៉ាងទៀតថា សាន់ដារ៉ាក់ (Sandarac) ទទួលយកអេតាណុល (Ethanol) ចាប់ពី ៨០% ឡើងទៅ។

**ការប្រើប្រាស់ទ្រីតុន X100 (Triton X100)៖ សូលុយស្យុងអាកុយ មិនមែនអ៊ីយ៉ុង (Non-ionic Aqueous Solution)**

ទ្រីតុន X100 មានទម្រង់ជាAqueous Solution មិនមែនអ៊ីយ៉ុង (Non-ionic) (សូលុយស្យុង 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol, ឬ t-octylphenoxypolyethoxyethanol, polyethylene glycol tert-octylphenyl ether) ដែលត្រូវបានគេប្រើប្រាស់យ៉ាងទូលំទូលាយជាភ្នាក់ងារសម្អាត (Detergent) ក្នុងជីវវិទ្យាកោសិកា (Cellular Biology) និងជីវវិទ្យា molecular biology (Molecular Biology)។ វាអនុញ្ញាតឱ្យមានភាពជ្រាបចូល (Permeabilization) នៃភ្នាសកោសិកា (Cell Membranes) និងភ្នាសនុយក្លេអែរ (Nuclear Membranes)។ សំណាកសត្វល្អិត (Insect Samples) ដែលរក្សាទុកក្នុងជាតិអាល់កុលអស់រយៈពេលជាច្រើនឆ្នាំ គឺជារឿងធម្មតា។ ជាអកុសល ការរក្សាទុកក្នុងអាល់កុលមិនល្អបំផុត (Optimal) ទេ ហើយarthropods (Arthropods) ដែលត្រូវបានរក្សាទុកដូច្នោះ ក្លាយទៅជាការលំបាកខ្លាំងក្នុងការរៀបចំសម្រាប់ការពិនិត្យមីក្រូទស្សន៍ (Microscopic Examination)។ ច្នាស្លឹកដែលផ្ទុកសំណាកច្រើនតែរលួយ (Degrade) បន្ទាប់មកដោយការហួតអាល់កុល (Evaporation of Alcohol)។ ក្នុងករណីទាំងពីរ ការប៉ះពាល់ជាមួយអាល់កុលយូរ (Prolonged Contact) ឬការស្ងួត (Drying) នៃសំណាកបង្កជាបញ្ហាពិតប្រាកដ។

ក្នុងឆ្នាំ ២០០៨ Jonque

បានបោះពុម្ពផ្សាយកំណត់ចំណាំស្តីពីការបញ្ជូលជាតិទឹកឡើងវិញ (ការដកជាតិទឹកឡើងវិញ) នៃសត្វពឹងពាង

(Spiders) ជាមួយនឹងភ្នាក់ងារធ្វើឱ្យសើម (Wetting Agent) ដូចជា អាហ្គេប៉ុន (Agepon)

ដែលប្រើសម្រាប់ខ្សែភាពយន្តថតរូប (Photographic Films) [២៦]។

នេះបាននាំឱ្យមានគំនិតនៃការប្រើប្រាស់ភ្នាក់ងារធ្វើឱ្យសើម (Wetting Agents)

ដែលមិនមែនជាភ្នាក់ងារសម្អាតខ្លាំង (Powerful Detergents)។

ខាងក្រោមនេះគឺជានីតិវិធី (Procedure) ដោយប្រើទ្រីតុន X100 ក្នុងសូលុយស្យុងអាគុយ ០,៥%៖

- ធ្វើឱ្យសំណាកស្ងួត (Dry Sample) ឆ្អែត (Impregnated) ជាមួយអាណុលសុទ្ធ (Absolute Alcohol)។
- បន្ថែមបរិមាណចាំបាច់នៃសូលុយស្យុងទ្រីតុន X100 ០,៥% ដើម្បីឱ្យសំណាកទាំងមូលត្រូវបានពន្លឺច (Immersed)។
- ទុកឱ្យឈរ (Allow to stand) ប្រហែល ៥ នាទី ឬច្រើនជាងនេះ។ arthropods (Arthropods) ទាំងអស់ត្រូវតែឯករាជ្យ (Become Independent) នៅក្នុងសូលុយស្យុង។
- យកសូលុយស្យុងទ្រីតុន X100 ចេញ (Removed) ហើយជំនួស (Replaced) ដោយសូលុយស្យុងប៉ូតាស្យូម អ៊ីដ្រូស៊ីត (Potassium Hydroxide Solution)។ បន្ទាប់មក អនុវត្តតាមបច្ចេកទេស (Technique) ដូចដែលបានពិពណ៌នាខាងលើ។

**ឧបសម្ព័ន្ធទី ៤៖**  
**ដំណាក់កាលនៃការប្រើប្រាស់ Mounting Media អ៊ីប៉ារ៉ាល់ (Euparal®) ឬ Canada Balsam (Canada Balsam) មួយជំហានម្តងៗ**

១. សំណាក (Specimens) ត្រូវតែខ្សោះជាតិទឹក (Dehydrated) (រូបរាងពាស (Cloudy) ឬ ស្រអាប់ដូចទឹកដោះ (Milky) បង្ហាញពីការខ្សោះជាតិទឹកមិនគ្រប់គ្រាន់)។
២. ការខ្សោះជាតិទឹក (Dehydration) អាចសម្រេចបានដោយបង្កើនកម្រិតកំហាប់ (Concentrations) នៃអេទីល អាណុល (Ethyl Alcohol)។
៣. សំណាកអាចត្រូវបានផ្ទេរ (Transferred) ពីអាណុល ៩៩% ឬ អាណុលសុទ្ធ (Absolute Alcohol) ទៅកាន់ភ្នាក់ងារធ្វើឱ្យស្អាត (Clearing Agent)។

**នីតិវិធី (Procedure):**

១. ដាក់ Phlebotomine sand fly ក្នុងអេតាណុល ៧០%។
២. យកអេតាណុលចេញ (Remove) ហើយជំនួស (Replace) ដោយ KOH ១០%។ គ្រប Phlebotomine ជាមួយកញ្ចក់ឡាម (Glass Slide)។
៣. ធ្វើម៉ាសេរ៉ាត (Macerate) រហូតទាល់តែសត្វស្លឹត ប្រែជាផ្លា។
៤. យក KOH ចេញ។
៥. គ្របសំណាក (Specimen) ជាមួយទឹកបិទ (Distilled Water) ហើយរង់ចាំ ៣០ ទៅ ៤៥ នាទី។
៦. យកទឹកចេញ ហើយធ្វើការលាងសម្អាត (Washing) ម្តងទៀតជាមួយទឹកចម្រោះរយៈពេល ៣០ នាទី (ពេលវេលាអាស្រ័យលើចំនួនសំណាក (Time Function of Numerous Samples)៖ សំណាកកាន់តែច្រើនដែលត្រូវដំណើរការវិភាគជាមួយគ្នា ពេលវេលានេះត្រូវតែគោរពឱ្យបានយូរ។ ប្រសិនបើមានកិច

ជាពិសេសសម្រាប់សំណាកដែលត្រូវបានព្យាបាលជាលក្ខណៈ  
 បុគ្គល (Treated Individually) ពេលវេលានេះអាចខ្លីជាង)  
 ៧. យកទឹកចេញ  
 ៨. បន្ថែមសូលុយស្យុង ម៉ាក-អង់ដ្រេ (Marc-André  
 Solution) (ដែលអាចមានពណ៌ដោយអាស៊ីតហ្វូស៊ីន  
 (Fuchsin Acid)) ហើយរង់ចាំ ២៤ ម៉ោង (មួយថ្ងៃ)។  
 ៩. យកសូលុយស្យុង ម៉ាក-អង់ដ្រេ ចេញ។  
 ១០. គ្របសំណាកជាមួយទឹកបិកហើយរង់ចាំ ៣០ ទៅ ៤៥  
 នាទី។  
 ១១. យកទឹកចេញ  
 ហើយធ្វើការលាងសម្អាតម្តងទៀតជាមួយទឹកចម្រោះរយៈ  
 ពេល ៣០ នាទី។  
 ១២. យកទឹកចេញ  
 ១៣. បន្ថែមអេតាណុល ៧០% ហើយធ្វើរះកាត់បំបែក  
 (Dissect) សំណាក។  
 ក. សម្រាប់ក្បាល (Head) និងពោះ (Abdomen) ទាញក្បាល  
 ឬពោះចេញពីដើមទ្រូង (Thorax) ថ្មមៗ។  
 ខ. សម្រាប់ដើមទ្រូង (Thorax) យកស្លាប (Wings)  
 ចេញដោយកាន់ដើមទ្រូងជាមួយកន្ទុយក្តាម (Forceps)  
 មួយគូ ហើយទាញនៅគល់នៃសរីរាង្គបន្ថែម (Base of the  
 Appendages) ជាមួយកន្ទុយក្តាមមួយគូទៀត។  
 វាអាចធ្វើការរះកាត់តាមបណ្តោយពាក់កណ្តាលខ្នង  
 (Sagittal Dissection)  
 ដោយបែងចែកដើមទ្រូងជាផ្នែកខាងឆ្វេង និងស្តាំ  
 អាស្រ័យលើតំបន់ដែលចាប់អារម្មណ៍បំផុត (Regions of  
 Greatest Interest)។  
 ១៤. ខ្សោះជាតិទឹក (Dehydrate) បន្តិចម្តងៗ (Gradually)  
 តាមរយៈសេរីនៃសូលុយស្យុងអេទីល អាល់កុល (Ethyl  
 Alcohol Solutions) ក្នុងទឹក។ ៥០ – ៨០ – ៩៥%  
 រហូតដល់អេតាណុលដាច់ខាត (Absolute Ethanol)។  
 ១៥. ខ្សោះជាតិទឹកសំណាក (Dehydrate the Specimens)  
 ដោយលាងសម្អាតពួកវាពីរដង ដងនីមួយៗ ១០ នាទី  
 ជាមួយអេតាណុល ១០០%។

១៦. យកអេតាណុលចេញ  
 ហើយគ្របសំណាកជាមួយប្រេងក្លូវ (Clove Oil) រយៈពេល  
 ១៥ នាទី នៅសីតុណ្ហភាពបន្ទប់ (Room Temperature)។  
 ១៧. ផ្ទេរ (Transfer) សំណាកពីប្រេងក្លូវទៅកាន់តំណក់  
 (Drop) នៃអឺប៉ារ៉ាល់ (Euparal®) ឬ Canada Balsam  
 (Canada Balsam) នៅលើស្លាយស្អាត (Clean Slide)។  
 ១៨. រៀបចំតាមការចង់បាន (Arrange as Desired)៖  
 ក្បាល ដើមទ្រូង  
 និងពោះរបស់Phlebotomineអាចត្រូវបានរះកាត់បំបែក  
 (Dissected) ដោយប្រើម្ជុលល្អ (Fine Needles) ឬ  
 កន្ទុយក្តាម (Forceps) ក្រោមមីក្រូទស្សន៍សម្រាប់រះកាត់  
 (Dissecting Microscope)។  
 ក្បាលត្រូវតែរះកាត់បំបែកចេញពីរាងកាយ  
 ដើម្បីmounting (Mounted) នៅក្នុងទីតាំងពោះ-ខ្នង  
 (Ventro-dorsal Position) ពោលគឺ  
 ប្រហោងខាងក្រោយក្បាល (Occipital Foramen)  
 ត្រូវតម្រង់ទៅលើ ដើម្បីឱ្យគេអាចសង្កេតឃើញស៊ីបារីយ៉ូម  
 (Cibarium) ដោយផ្ទាល់តាមរយៈវា។  
 ការរះកាត់បំបែក (Dissection)  
 ត្រូវបានអនុវត្តនៅក្នុងឧបករណ៍ផ្គុំ (Mounting  
 Medium) របស់Phlebotomine។  
 ១៩. ទុកសំណាក (Specimen)  
 រហូតដល់ផ្ទៃរបស់វាក្លាយទៅជាស្អិត (Sticky)។  
 ២០. ធ្វើឱ្យគ្របស្លាយ (ឡាម៉ែល) ស្អាត សើម (Wet)  
 ជាមួយអាល់កុលសុទ្ធ (Absolute Alcohol)។  
 ទម្លាក់គ្របស្លាយទៅលើCanada Balsam (Canada  
 Balsam) នៅមុំមួយ (At an Angle)។  
 ២១. ទុកស្លាយ (Slides) ក្នុងប្រអប់ស្អិត (Dry Box)  
 ដែលមានគោលបំណងសម្រាប់ទម្រង់ការនេះ។