


ຂັ້ນຕອນການກະກຽມຕົວຢ່າງ ແລະ ການແຕ່ງສະໄລຕົວຢ່າງຮື້ນຝອຍຊາຍ: ຄູ່ມືມາດຕະຖານເອກະພາບ

Fano José Randrianambinintsoa¹, Laure Augendre¹, Jorian Prudhomme¹, Jean-Philippe Martinet¹, Mathieu Loyer¹, Nalia Mekarnia¹, Hocine Kerkoub¹, Farzana Khan Perveen¹, Antoine Huguenin^{1,2}, Emilie Kariya^{1,2}, Mohammad Akhouni³, Andrey José de Andrade⁴, Eduardo Berriatua⁵, Gioia Bongiorno⁶, Sébastien Boyer^{7,8}, Vasiliki Christodoulou⁹, Magda Clara Vieira Da Costa-Ribeiro¹⁰, Lucas Alexandre Farias de Souza¹⁰, Huicong Ding¹¹, Blaise Dondji¹², Vít Dvořák¹³, Ozge Erisoz Kasap¹⁴, Eunice Aparecida Bianchi Galati¹⁵, Montserrat Gállego¹⁶, Cristina Ballart¹⁶, Stavroula Gouzelou¹⁷, Nabil Haddad¹⁸, Rezki Sabrina Masse¹⁹, Asrat Hailu Mekuria²⁰, Vladimir Iovic²¹, Szymon Kaczmarek²², Mohd Khadri Shahar¹⁹, Oscar D. Kirstein²³, Edwin Kniha²⁴, Iva Kolářová¹³, Lincoln Timinao²⁵, Cristian Lucanas²⁶, Ognyan Mikov²⁷, Kimsear Nov⁷, Yusuf Özbel²⁸, Bernard Pesson²⁹, Laura Cristina Posada Lopez³⁰, Didot Budi Prasetyo^{1,7}, Nil Rahola³¹, Eduardo A. Rebollar-Tellez³², Bruno Leite Rodrigues¹⁵, Lalita Roy³³, Prasanta Saini³⁴, Chizu Sanjoba³⁵, Paloma Helena Fernandes Shimabukuro³⁶, Padet Siriyasatien³⁷, Agnieszka Soszyńska²², Tatiana Suleşco³⁸, Massamba Sylla³⁹, Majhalia Torno⁴⁰, Petr Volf¹³, Khamsing Vongphayloth⁴¹, Vu Sinh Nam⁴², April Wardhana⁴³, Eric Yessinou⁴⁴, Sonia Zapata⁴⁵, Jean-Charles Gantier¹, and Jérôme Depaquit^{1,2,*} 

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Edited by Jean-Lou Justine

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ບົດຄັດຫຍໍ້ – ບົດຄວາມນີ້ນຳສະເໜີແນວທາງທີ່ຄົບຖ້ວນສຳລັບຂັ້ນຕອນການກະກຽມ ແລະ ການແຕ່ງສະໄລ ຕົວຢ່າງຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ເຊິ່ງເປັນຂັ້ນຕອນສຳຄັນສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດ ແລະ ການກວດຫາ ຫຼື ປຸກແຍກເຊື້ອພະຍາດ. ເນື້ອໃນໄດ້ກ່າວເຖິງເຕັກນິກຫຼາຍຮູບແບບ ທີ່ເໝາະສົມທັງສຳລັບການເຮັດວຽກພາກສະໜາມ ແລະ ການປະຕິບັດງານໃນຫ້ອງວິເຄາະ. ແນວທາງນີ້ປະກອບມີຄຳແນະນຳລະອຽດກ່ຽວກັບ ການເກັບຕົວຢ່າງ, ການຈັດການ, ການຂົນຍ້າຍ ແລະ ການເຮັດໃຫ້ຕາຍ (ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ການແຊ້ແຂງແບບແຫ້ງ ຫຼື CO₂ ແທນການໃຊ້ສານເຄມີ) ພ້ອມທັງ ຍຸດທະສາດການຮັກສາຕົວຢ່າງ ເຊັ່ນ ການເກັບໄວ້ໃນອຸນຫະພູມຕໍ່າ ຫຼື ການເກັບໃນເຫຼົ້າເອທານອນ. ຄຸນນະພາບຂອງການກະກຽມໂຄງສ້າງທາງກາຍະວິທະຍາບາງສ່ວນ (ເຊັ່ນ ອະໄວຍະວະສືບພັນ, ຫົວ ແລະ ປີກ) ມີຄວາມສຳຄັນຢ່າງຫຼວງຫຼາຍ ສຳລັບການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ ແລະ ໄດ້ຖືກອະທິບາຍໄວ້ໃນບົດຄວາມນີ້. ນອກນັ້ນ ຍັງມີການອະທິບາຍລາຍລະອຽດຂັ້ນຕອນການກະກຽມແຕ່ງຕົວຢ່າງ ລວມເຖິງຂະບວນການເຮັດໃຫ້ໃສ (clearing) ໂດຍໃຊ້ສານເຊັ່ນ potassium hydroxide ແລະ ນ້ຳຢາ Marc-André. ຂັ້ນຕອນການແຕ່ງສະໄລໄດ້ປຽບທຽບໂດຍໃຊ້ນ້ຳຢາແຕ່ງຫຼາຍຊະນິດ ໂດຍເນັ້ນໃສ່ຄຸນສົມບັດທາງແສງ ແລະ ຄວາມສາມາດໃນການຮັກສາໄລຍະຍາວ. ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ Hoyer fluid (ຫຼື chloral gum) ສຳລັບການສັງເກດແບບຮີບດ່ວນ ໂດຍສະເພາະຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອເນື່ອງຈາກມີຄວາມໃສຊັດເຈນ ແຕ່ບໍ່ເໝາະສົມສຳລັບການເກັບຮັກສາໄລຍະຍາວ. ສຳລັບນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລອື່ນໆ ທີ່ໄດ້ກ່າວເຖິງ ປະກອບມີ polyvinyl alcohol, Euparal® (ສຳລັບຄວາມທົນທານນ້ຳທີ່ຈຳກັດ) ແລະ Canada balsam (ນ້ຳຢາທີ່ລະລາຍໃນ hydrocarbon) ໂດຍສອງຊະນິດຫຼັງນີ້ເໝາະສຳລັບການຮັກສາໄລຍະຍາວ. ບົດຄວາມຍັງໄດ້ກ່າວເຖິງແນວທາງຊີວະພັນທຸກຳສະໄໝໃໝ່ ເຊັ່ນ ການຈັດລຳດັບ DNA ແລະ MALDI-ToF ທີ່ຕ້ອງໃຫ້ຄວາມໃສ່ໃຈພິເສດໃນຂັ້ນຕອນການກະກຽມຕົວຢ່າງ. ນອກນັ້ນ ຍັງມີຄລິບວິດີໂອສັ້ນໆ ສະແດງວິທີການແຕ່ງສະໄລແບບຕ່າງໆ ພ້ອມການແປເປັນ 33 ພາສາ ເພື່ອໃຫ້ແນວທາງນີ້ສາມາດຕອບສະໜອງຄວາມຕ້ອງການຂອງຊຸມຊົນນັກວິທະຍາສາດໃນທົ່ວໂລກ.

ຄຳສັບສຳຄັນ (Key words): ການແຕ້ງສະໄລຕົວຢ່າງ, ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ນ້ຳຢາແຕ້ງສະໄລ Hoyer, Marc-André, Chloral gum, Polyvinyl alcohol, Euparal®, Canada balsam, ການປຸກແຍກເຊື້ອ *Leishmania*, ເງື່ອນໄຂການເກັບຕົວຢ່າງໃນພາກສະໜາມ, ການປຸກເຊື້ອ, ການຜ່າຕັດ, ຊີວະໂມເລກູນ, MALDI-ToF, Type-specimens

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

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

ບົດນຳ

ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ (Phlebotomine sand flies) ແມ່ນແມງໄມ້ທີ່ມີສອງປີກຂະໜາດນ້ອຍ ຢູ່ໃນວົງສະກຸນ Psychodidae ແລະ ວົງຍ່ອຍ Phlebotominae ໂດຍມີຢ່າງໜ້ອຍ 1,063 ຊະນິດ ທີ່ຖືກລາຍງານແລ້ວ [21]. ພວກມັນເປັນພາຫະນະນຳເຊື້ອພະຍາດທີ່ສຳຄັນ (*Leishmania*, arboviruses ແລະ *Bartonella*) ຊຶ່ງເປັນສາເຫດຂອງພະຍາດ leishmaniasis, ການຕິດເຊື້ອ arbovirus ແລະ bartonellosis ຕາມລຳດັບ.

ການຈຳແນກຊະນິດຂອງພວກມັນອາໄສການສັງເກດລາຍລະອຽດດ້ວຍ ກ້ອງຈຸລະທັດເປັນຫຼັກ ໂດຍອີງໃສ່ການເກັບຕົວຢ່າງຢ່າງລະມັດລະວັງ, ການເກັບຮັກສາຢ່າງເໝາະສົມ ແລະ ການແຕ້ງສະໄລທີ່ຊຳນານ ເຊິ່ງຕ້ອງອາໄສເຕັກນິກສະເພາະຫຼາຍວິທີ ແຕ່ລະວິທີກໍ່ມີຂໍ້ດີ ແລະ ຂໍ້ຈຳກັດທີ່ແຕກຕ່າງກັນ.

ການຈຳແນກຊະນິດ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍໂຕແກ້ ອາໄສການສັງເກດເບິ່ງໂຄງສ້າງພາຍນອກ (ເຊັ່ນ: ໜວດ (antennae), ພາກສ່ວນປາກ (palpi), ອະໄວຍະວະສືບພັນຕົວຜູ້ (male genitalia)) ແລະ ໂຄງສ້າງພາຍໃນ (ເຊັ່ນ: ທໍ່ຄໍ (pharynx), ຊີບາຣຽມ (cibarium), ແລະ ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae), ການຜ່າຕັດ ແລະ ການແຍກອອກຂອງໂຄງສ້າງພາຍໃນເຫຼົ່ານີ້ ຊ່ວຍໃຫ້ສາມາດສັງເກດເບິ່ງໄດ້ງ່າຍ ແລະ ນຳໄປສູ່ການຈຳແນກຊະນິດທີ່ຖືກຕ້ອງ. ດັ່ງນັ້ນ, ຕ່າງຈາກແມງໄມ້ຍຸງ ຫຼື ແມງໄມ້ຈຸບ, ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ຕ້ອງການການແຕ້ງສະໄລ ລະຫວ່າງແຜ່ນແກ້ວ ແລະ ແຜ່ນປົກກ່ອນທີ່ຈະດຳເນີນການຈຳແນກຊະນິດ. ຈົນເຖິງຊຸມປີ 1980, ການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ (microscopic observation) ແມ່ນວິທີດຽວທີ່ມີຢູ່ ສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ແລະ ມັນຍັງຄົງເປັນວິທີທີ່ນຳໃຊ້ຢ່າງກວ້າງຂວາງທີ່ສຸດໃນປັດຈຸບັນ. ການເລືອກຂັ້ນຕອນ ແລະ ການກະກຽມຕົວຢ່າງ ຈຶ່ງຄອນຂ້າງງາຍກວ່າ ແລະ ອີງໃສ່ການແບ່ງເປັນສອງປະເພດດັ່ງນີ້: ດ້ານໜຶ່ງແມ່ນການແຕ້ງສະໄລຖາແບບອວນ (definitive mounting) ທີ່ອະນຸຍາດໃຫ້ຮັກສາຕົວຢ່າງໄດ້ໃນໄລຍະຍາວ, ແລະ ອີກດ້ານໜຶ່ງແມ່ນການແຕ້ງສະໄລແບບໄວ (rapid mounting) ສຳ

ລັບການຈຳແນກຊະນິດ ໃນສານນ້ຳຢາທີ່ບໍ່ຮັບປະກັນການຮັກສາໄດ້ໃນໄລຍະຍາວ. ສຸດທ້າຍ, ການແຕ້ງສະໄລ ເຊັ່ນ: ໃນຢາງ (resin) ເຊັ່ນ Canada balsam, ໃຊ້ເວລາຫຼາຍ, ຕ້ອງການການດຶງນ້ຳອອກຢ່າງສົມບູນຂອງຕົວຢ່າງ (complete dehydration). ນອກຈາກນີ້, ດັດສະນີສະທ້ອນແສງ (refractive index) ຂອງສານນີ້ບໍ່ແມ່ນດີທີ່ສຸດສະເໝີໄປ ສຳລັບການສັງເກດເບິ່ງ ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae) ໄດ້ງ່າຍ. ໃນທາງກົງກັນຂ້າມ, ການແຕ້ງສະໄລໃນນ້ຳຢາທີ່ເປັນນ້ຳ (aqueous medium) ເຊັ່ນ Hoyer liquid ແມ່ນໄວກວ່າ ແລະ ເຮັດໃຫ້ເບິ່ງ ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae) ທີ່ມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງໄດ້ດີກວ່າ, ແຕ່ບໍ່ສາມາດຮັກສາສະໄລໄດ້ໃນໄລຍະຍາວ ເພາະມັນແນວໂນ້ມທີ່ຈະດູດຊຶມນ້ຳຈາກບັນຍາກາດ. ທາງເລືອກໜຶ່ງແມ່ນການປົກແຜ່ນແກ້ວດ້ວຍນ້ຳມັນທາເລັບ (nail polish) ເມື່ອມັນແຫ້ງສົມບູນແລ້ວ. ອີງປະກອບເຫຼົ່ານີ້ມີຄວາມກ່ຽວຂ້ອງ ແລະ ມີຜົນຕໍ່ການເລືອກວິທີການກຽມຕົວຢ່າງ ໂດຍອີງຕາມຈຸດປະສົງທີ່ດຳເນີນການ. ນັບແຕ່ຊຸມປີ 1980 ເປັນຕົ້ນມາ, ການສຶກສາການຈຳແນກຊະນິດ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ໄດ້ປະສົມຜະສານ ວິທີການສັງເກດເບິ່ງລັກສະນະຮູບຮ່າງ (morphology) ແລະ ວິທີການຊີວະເຄມີ (biochemical approaches). ທຳອິດແມ່ນການວິເຄາະ hydrocarbon (cuticular hydrocarbon analyses), ເຊິ່ງໄດ້ຖືກປ່ຽນແທນຢ່າງໄວດ້ວຍເຕັກນິກຊີວະໂມເລກູນ (molecular biology techniques) ເຊັ່ນ: ການເພີ່ມຈຳນວນ DNA ແບບສຸ້ມຫຼາຍຈຸດ (random amplified polymorphic DNA (RAPD)), ການຈຳກັດການວິເຄາະຄວາມຍາວເປັນທ່ອນ (restriction fragment length polymorphism (RFLP)), ການເພີ່ມຈຳນວນ DNA ແລະ ການສະແດງລຳດັບກຳມະພັນ (sequencing) ໂດຍໃຊ້ວິທີຂອງ Sanger (Sanger method), ພ້ອມທັງການສະແດງລຳດັບກຳມະພັນທັງໝົດ (next-generation sequencing (NGS)). ໃນປັດຈຸບັນ, ວິທີການຊີວະໂມເລກູນ

ໄດ້ຖືກເສີມດ້ວຍວິທີການທາງໂປຼຕິນ proteomic ເຊັ່ນ MALDI-ToF. ນອກຈາກນີ້, ການຈຳແນກຊະນິດດ້ວຍໂມເລກູນສາມາດປະສົມປະສານກັບການຊອກຫາເຊື້ອທີ່ກໍ່ໃຫ້ເກີດພະຍາດ (pathogens) ດ້ວຍ PCR (Leishmania, Trypanosoma, Bartonella, ແລະ Phlebovirus) ເນື່ອງຈາກທັງໝົດນີ້ສາມາດກວດຫາເຊື້ອໄດ້ດ້ວຍ end-point PCR ແລະ real-time PCR, ເຊິ່ງຕ້ອງການການຂັ້ນຕອນການເກັບຕົວຢ່າງທີ່ຖືກຕ້ອງ ແລະ ການເກັບຮັກສາ ໃຫ້ເໝາະສົມກັບເປົ້າໝາຍທີ່ກຳນົດໄວ້ [3, 32]. ນອກຈາກລັກສະນະຮູບຮ່າງທີ່ໃຊ້ປະຈຳໃນການແຍກຊະນິດ, ວິທີການທາງດ້ານຮູບຮ່າງອື່ນໆ ຍັງສາມາດນຳໃຊ້ໄດ້ (ເຊັ່ນ: ການວິເຄາະທາງເລຂາຄະນິດຂອງຮູບຮ່າງປົກ (wing geomorphometry)).

ອີງຕາມປະສົບການຂອງຜູ້ຂຽນເອງ ແລະ ຂໍ້ມູນຈາກເອກະສານອ້າງອີງ ຕ່າງໆ, ຈຸດປະສົງຂອງການສຶກສານີ້ແມ່ນເພື່ອສະໜອງແນວທາງການປະຕິບັດ (ຄູ່ມື) ມາດຕະຖານ (standardized guidelines) ສຳລັບການແຕ້ງສະໄລ ແລະ ການກະກຽມຕົວຢ່າງ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍໂຕແກ້ ເພື່ອເພີ່ມປະສິດທິພາບໃນການວິເຄາະລັກສະນະຮູບຮ່າງ ແລະ ການວິເຄາະທາງດ້ານຊີວະໂມເລກູນ.

ຄວາມຕ້ອງການໃນການດຳເນີນການວິເຄາະບາງປະເພດ (ເຊັ່ນ: ການວິເຄາະທາງດ້ານຊີວະໂມເລກູນ (molecular biology) ຫຼື MALDI-ToF) ຕ້ອງການການຮັກສາສ່ວນໜຶ່ງຂອງຮື້ນຝ່ອຍຊາຍທີ່ບໍ່ຈຳເປັນສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດດ້ວຍລັກສະນະຮູບຮ່າງ (morphological identification), ເຊິ່ງເນັ້ນໃຫ້ເຫັນເຖິງຄວາມຈຳເປັນໃນການເລືອກຂັ້ນຕອນໂປຣໂຕຄອນ (protocol) ທີ່ສຳຄັນ.

ໃນບົດຄວາມນີ້, ພວກເຮົາສຸມໃສ່ວິທີການໃນການໃຫ້ຢາສະຫຼົບ (anesthesia) ແລະ ການເຮັດໃຫ້ຕາຍ (euthanasia) ຂອງຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຈັບໄດ້ຍັງມີຊີວິດ, ການເກັບຮັກສາ, ແລະ ຂັ້ນຕອນການແຕ້ງສະໄລ (mounting process), ເພື່ອການຈຳແນກຊະນິດໄວ (rapid identification) ຫຼື ເພື່ອການຮັກສາຕົວຢ່າງໃນໄລຍະຍາວ (long-term conservation) ທີ່ອະນຸຍາດໃຫ້ສາມາດດຳເນີນການສຶກສາຂັ້ນຕໍ່ໄປໄດ້.

1. ການຈັບຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ

ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍໂຕແກ້ ສາມາດຈັບໄດ້ທັງຍັງມີຊີວິດ ແລະ ຕາຍແລ້ວ ໂດຍໃຊ້ຫຼາຍວິທີການ ເຊັ່ນ: ກັບດັກແສງ CDC (CDC miniature light traps), ກັບດັກຕິດກາວ (sticky traps), ແລະ ເຄື່ອງດູດ (aspirators) ຮ່ວມກັບ Shannon traps, ຫຼື ຈັບໂດຍກົງຈາກບ່ອນພັກຜ່ອນໃນສະພາບແວດລ້ອມ (ເຊັ່ນ: ບ່ອນລ້ຽງສັດ). ວິທີການເຫຼົ່ານີ້

ກ່ຽວຂ້ອງກັບການວາງກັບດັກໃນທີ່ຢູ່ອາໄສທີ່ເໝາະສົມ, ດຶງດູດຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ດ້ວຍແສງ ຫຼື ສານດຶງດູດ (ສານລໍ້) ອື່ນໆ (CO₂ ຫຼື ສານລໍ້ເຄີມີ), ແລະ ກັບເອົາມາເພື່ອການວິເຄາະຕໍ່ໄປ, ດັ່ງທີ່ອະທິບາຍໄວ້ໃນເອກະສານຫຼາຍສະບັບ [2, 3, 32, 36, 49]. ການຈັບຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຍັງມີຊີວິດ ເຮັດໃຫ້ສາມາດດຳເນີນການການສຶກສາຕໍ່ໄດ້ທຸກຂັ້ນຕອນ ໃນຂະນະທີ່ການເກັບຕົວທີ່ຕາຍແລ້ວ ຈະບໍ່ສາມາດປຸກແຍກເຊື້ອ Leishmania ຫຼື ໄວຣັສໄດ້.

ບາງວິທີການຈັບ ເຊັ່ນ: ເຈ້ຍຕິດກາວ (sticky papers) ມັກເຮັດໃຫ້ເກີດການສູນເສຍອະໄວຍະວະຂອງ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ (ໜວດ (antennae), ພາກສ່ວນປາກ (palps), ປີກ, ຫຼື ຂາ). ນອກຈາກນີ້, ເຈ້ຍຕິດກາວທີ່ໃຊ້ນຳມັນ castor oil ຈະຕິດຕົວ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ

ຕ້ອງການການກຳຈັດອອກໃນຂັ້ນຕອນກະກຽມຕົວຢ່າງ ທຳ ອິດ, ປົກກະຕິໃຊ້ການແຊ້ໃນນ້ຳສົມປະສົມ ethanol ແລະ diethyl ether ອັດຕາສ່ວນເທົ່າກັນ ເປັນເວລາ 15 ນາທີ.

2. ການເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງສະຫລົບ

ຫຼັງຈາກການເກັບຕົວຢ່າງ, ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍທີ່ຍັງມີຊີວິດຕ້ອງໄດ້ເຮັດໃຫ້ຕາຍກ່ອນ. ບາງວິທີການເກັບ (ເຊັ່ນ: ເຈ້ຍຕິດ, ກັບດັກແສງ CDC ທີ່ຕິດຕັ້ງກັບກ່ອງທີ່ມີນ້ຳຢາຫຼືເຫຼົ້າເອທານອລ) ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ຈະຕາຍທັນທີທີ່ເກັບມາໄດ້. ການວິເຄາະຊີວະໂມເລກູນ ສາມາດນຳໃຊ້ໄດ້ ກັບຕົວຢ່າງທີ່ເກັບໃສ່ເຫຼົ້າເອທານອລໂດຍກົງ ແລະ ກັບຕົວຢ່າງທີ່ເກັບໃສ່ສານອື່ນໆ

ຖ້າປ່ຽນໃສ່ເຫຼົ້າເອທານອລໃຫ້ໄວເທົ່າທີ່ໄວໄດ້ຫຼັງຈາກການເກັບຕົວຢ່າງ, ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ວິທີການເຮັດໃຫ້ຕາຍຂ້າງເທິງນີ້ ບໍ່ສາມາດນຳມາໃຊ້ໃນການວິເຄາະທາງດ້ານ MALDI-ToF. ນອກຈາກນີ້, ບາງວິທີການເຮັດໃຫ້ຕາຍ ອາດເຮັດໃຫ້ສູນເສຍລັກສະນະຮູບຮ່າງບາງຢ່າງ. ດັ່ງນັ້ນ, ຈຳເປັນຕ້ອງໃຊ້ສານເຮັດໃຫ້ຕາຍມາດຕະຖານທີ່ເໝາະສົມ ເພື່ອຮັບປະກັນການຈຳແນກຊະນິດທີ່ຖືກຕ້ອງ ຫຼື ການຮັກສາຕົວຢ່າງໃນໄລຍະຍາວ ເພື່ອເປັນຕົວຢ່າງອ້າງອີງ (voucher specimens) (ເຊັ່ນ: ຕົວຢ່າງທີ່ຮັກສາໄວ້ ແລະ ເກັບຮັກສາເພື່ອເປັນຕົວຢ່າງອ້າງອີງ ຫຼື ປຽບທຽບໃນອະນາຄົດ).ສານເຄມີເຊັ່ນ ethyl acetate, ethyl ether, tetrachloroethane, ແລະ chloroform ສາມາດແຊ້ໃສ່ຝ່າຍ ແລະ ວາງໃນພາຊະນະບົດທີ່ມີ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ເພື່ອເຮັດໃຫ້ຕາຍ. ສານເຫຼົ່ານີ້ ຕ້ອງຈັດການດ້ວຍຄວາມລະມັດລະວັງ ຕາມຄຳແນະນຳຂອງຜູ້ຜະລິດ ເນື່ອງຈາກຄວາມເປັນພິດ.

ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ພວກເຮົາບໍ່ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ chloroform ເພື່ອເຮັດໃຫ້ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍຕາຍ ເພາະຈາກປະສົບການຂອງພວກເຮົາ ມັນບໍ່ເໝາະສົມກັບການສຶກສາຊີວະໂມເລກູນ. ເນື່ອງຈາກຄວາມອັນຕະລາຍຂອງສານເຫຼົ່ານີ້ ແລະ ຄວາມບໍ່ແນ່ນອນໃນການນຳໃຊ້ກັບການວິເຄາະໂມເລກູນ, ການໃຊ້ສານເຄມີເຫຼົ່ານີ້ ທົ່ວໄປແລ້ວບໍ່ໄດ້ຮັບການແນະນຳ.

ວິທີການທີ່ນຳໃຊ້ກວ້າງຂວາງທີ່ສຸດ ແລະ ຮັກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງຂອງຕົວຢ່າງ, DNA ຫຼື ໂປຣຕິນ ໄດ້ດີ ແມ່ນການແຊ້ແຂງ (dry freezing). ຕົວຢ່າງຕ້ອງແຊ້ແຂງເປັນເວລາພຽງພໍເພື່ອໃຫ້ຕົວຢ່າງສະຫລົບຢ່າງສົມບູນ ແຕ່ບໍ່ໃຫ້ດິນເກີນໄປຈົນ (i) ຕົວຢ່າງແຂງແຫ້ງຈົນເກີນໄປ ຫຼື (ii) ສິ່ງຜົນກະທົບຕໍ່ການມີຊີວິດຂອງ ເຊື້ອ Leishmania ຖ້າຈຸດປະສົງແມ່ນການແຍກເຊື້ອໃນຫ້ອງທົດລອງ (in vitro) ຈາກລະບົບຍ່ອຍອາຫານຂອງ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ. ດັ່ງນັ້ນ ພວກເຮົາແນະນຳໃຫ້ແຊ້ແຂງ 15 ຫາ 20 ນາທີ ທີ່ -20°C ແລະ ຕິດຕາມຢ່າງເປັນປະຈຳ ເພື່ອຮັບປະກັນວ່າພວກມັນພຽງແຕ່ລະຫງົບພຽງພໍ ໂດຍບໍ່ເຮັດໃຫ້ Leishmania ຕາຍ.

ຖ້າບໍ່ມີຕໍ່ແຊ້ແຂງ, ຮື້ນສາມາດເຮັດໃຫ້ສະຫຼົບດ້ວຍ CO₂ ໄດ້. ໃນເງື່ອນໄຂໃນພາກສະໜາມທີ່ບໍ່ສາມາດໃຊ້ກະປ້ອງສະເພາະໃສ່ CO₂ ໄດ້, ຕົວຢ່າງສາມາດເຮັດໃຫ້ຕາຍດ້ວຍກະປ້ອງ CO₂ ຂະໜາດນ້ອຍທີ່ໃຊ້ໃນ ‘Soda siphons’ (ເຄື່ອງໃສ່ເຄື່ອງດື່ມ), ແຕ່ອາດມີຂໍ້ຈຳກັດກ່ຽວກັບການຂົນສົ່ງທາງອາກາດ. ເປັນທາງເລືອກສຸດທ້າຍ, ແມງສາມາດເຮັດໃຫ້ຕາຍດ້ວຍການສຳຜັດກັບຄວັນຢາສູບ. ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍທີ່ຈັບແບບມີຊີວິດໃນກັບດັກ ແລະ ເກັບດ້ວຍເຄື່ອງດູດທີ່ຮັກສາໄວ້ໃນແທງແກ້ວ, ແລະ

CDC, ແລະ

ຖ້າໄດ້ສຳຜັດກັບຄວັນຢາສູບຈະຕາຍໃນວິນາທີ. ວິທີນີ້
 ນຳໃຊ້ໄດ້ໃນເງື່ອນໄຂໃນພາກສະໜາມທຸກປະເພດ
 ແມ່ແຕ່ໃນເງື່ອນໄຂທີ່ທາງໄກສອກຫຼີກ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ,
 ເນື່ອງຈາກແທ່ງແກ້ວຈະມີຄວັນແທນແກ້ວ,
 ມັນຈະບໍ່ສາມາດນຳໃຊ້ເກັບ ແລະ
 ຮັກສາຮິນຝ່ອຍຊາຍທີ່ຍັງມີຊີວິດໄດ້ອີກ
 ຈົນກວ່າຈະເຮັດຄວາມສະອາດຢ່າງດີ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ,
 ເຄື່ອງດູດດຽວກັນທີ່ບໍ່ໄດ້ເຮັດຄວາມສະອາດ
 ຍັງສາມາດນຳໃຊ້ເຮັດໃຫ້ຮິນຝ່ອຍຊາຍຈາກຕູ້ດັກອື່ນໆຕາຍ
 ເພື່ອຈຸດປະສົງການຮັກສາຕົວຢ່າງ. ນອກຈາກນີ້
 ຕ້ອງກວດສອບວ່າຕົວຢ່າງທັງໝົດໄດ້ຖືກເອົາອອກຈາກເຄື່ອງດູດແລ້ວ.
 ວິທີການເຫຼົ່ານີ້ ສາມາດໃຊ້ໄດ້ກັບການແຍກເຊື້ອ *Leishmania*
 ດ້ວຍການຜ່າຕັດລະບົບຍ່ອຍອາຫານ.

ຄຳແນະນຳເພີ່ມເຕີມ: ການພິຈາລະນາເລື່ອງຄວາມປອດໄພ ແລະ ກົດລະບຽບຄວນອ້າງອີງເອກະສານໃນຂໍ້ມູນຄວາມປອດໄພທີ່ ກ່ຽວຂ້ອງ (Safety Data Sheets - SDS).

ສານເຄມີທຸກຊະນິດທີ່ນຳສະເໜີໃນແນວທາງນີ້
 ຕ້ອງຈັດການພາຍໃຕ້ເງື່ອນໄຂຄວາມປອດໄພຢ່າງເຂັ້ມງວດ.
 ຄະນະກຳມະການສຸຂະພາບ ແລະ ຄວາມປອດໄພ
 ຂອງສະຖາບັນຄົ້ນຄວ້າ ພ້ອມທັງຈະໃຫ້ຂໍ້ມູນແກ່ທ່ານ
 ບໍ່ພຽງແຕ່ກ່ຽວກັບອັນຕະລາຍຂອງສານເຄມີເຫຼົ່ານີ້ເທົ່ານັ້ນ,
 ແຕ່ຍັງກ່ຽວກັບຂັ້ນຕອນການຈັດການ ແລະ
 ການກຳຈັດສິ່ງເສດເຫຼືອອີກດ້ວຍ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ,
 ການປະຕິບັດຕາມຄຳແນະນຳດ້ານຄວາມປອດໄພກ່ຽວກັບການນຳໃຊ້
 ແລະ ການກຳຈັດ ແມ່ນເປັນເລື່ອງບັງຄັບ. ແນ່ນອນວ່າ,
 ມັນເປັນຄວາມຮັບຜິດຊອບຂອງຜູ້ໃຊ້ທຸກຄົນເພື່ອຮັບປະກັນການປະຕິບັດ
 ຕາມການປະຕິບັດການໃນຫ້ອງທົດລອງທີ່ດີ ແລະ ປອດໄພ
 ພາຍໃຕ້ກົດໝາຍ ແລະ ກົດລະບຽບທີ່ກ່ຽວຂ້ອງຂອງປະເທດ
 ຫຼືສະຖາບັນການຄົ້ນຄວ້າຂອງຕົນ.
 ນອກຈາກນັ້ນ, ສານເຄມີບາງຊະນິດ,
 ຫຼືອີງປະກອບຂອງພວກມັນ (ຕົວຢ່າງ chloral hydrate)
 ຖືກຄວບຄຸມຢູ່ໃນບາງປະເທດ. ບັນຊີລາຍຊື່ຂອງຕົວຫຍໍ້ທີ່ໃຊ້ໃນ
 ຄູ່ມືສະບັບນີ້ແມ່ນສະແດງໃຫ້ຢູ່ໃນຕາຕະລາງ 1.

ຕາຕະລາງ 1: ລາຍຊື່ຄຳຫຍໍ້ຕ່າງໆ.

ADN	Deoxyribonucleic acid
ARN	Ribonucleic acid
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
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	ການເພີ່ມຈຳນວນດ້ວຍ Polymerase chain reaction
RDP Laos	ສ ປປ ລາວ
PNOC	Prepronociceptin gene
qPCR	Quantitative PCR (real-time PCR)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RI	ດັດສະນີການສະທ້ອນແສງ (Refractive index)
RNases	Ribonucleases
RNASS	RNA stabilization solution
RT-PCR	Reverse transcription PCR
TFA	Trifluoroacetic acid

3. ການເກັບຮັກສາຕົວຢ່າງກ່ອນການດຳເນີນ ການກະກຽມຕົວຢ່າງ

ປະກອບມີຫ້າວິທີຫຼັກ ກ່ອນການດຳເນີນການກະກຽມຕົວຢ່າງ:

3.1. ການແຊີແຊງ

ວິທີນີ້ດີທີ່ສຸດໃນ -20°C ຫຼື ດີກວ່າໃນ -80°C .
 ວິທີການເກັບຮັກສານີ້
 ປະຈຸບັນນຳໃຊ້ຢ່າງກວ້າງຂວາງກວ່າການເກັບໃນນ້ຳໄໝໂຕຣເຈນ.
 ໃນທຸກກໍລະນີ, ການເກັບຮັກສາດ້ວຍຄວາມເຢັນ
 ຕ້ອງດຳເນີນໄວທີ່ສຸດຫຼັງຈາກສະຫຼຽບຕົວຢ່າງ.
 ການເກັບຮັກສາໃນຕູ້ແຊີແຊງ ມີຂໍ້ດີຄືຮັກສາໂຕແມງໄມໂອງ, ພ້ອມກັບ
 RNA, DNA ແລະ ໂປຣຕີນ ໃຫ້ຄົງສະພາບສົມບູນ
 ຕະຫຼອດໄລຍະເກັບຮັກສາ. ສ່ວນໄໝໂຕຣເຈນແຫຼວ ອາດເຮັດໃຫ້ປົກ,
 ຂາ, ພາກສ່ວນປາກ ແລະ ໜວດ ເສຍຫາຍຫຼາຍ, ຂາດອອກ ແລະ
 ບາງຄັ້ງສູນເສຍລັກສະນະທາງຮູບຮ່າງທີ່ສຳຄັນ.
 ການເກັບແຊີແຊງແຫງີເປັນອັນຕະລາຍໜ້ອຍກວ່າຕໍ່ຕົວຢ່າງ, ແຕ່ບໍ່
 ເໝາະສົມສຳລັບການຮັກສາອະໄວຍະວະທີ່ອ່ອນ. ສຳຄັນກວ່ານັ້ນ, ປົກ,
 ໜວດ, ພາກສ່ວນປາກ ຫຼື ຂາ ອາດຕິດກັບຫຼອດເກັບຕົວຢ່າງ ແລະ
 ຖືກດຶງອອກໄດ້ເນື່ອງຈາກການເປື້ອນຂອງນ້ຳກ້ອນ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ,
 ການຮັກສາດ້ວຍການແຊີແຊງ
 ບໍ່ສະດວກສະບາຍໃນການສຶກສາໃນພາກສະໜາມ
 ເພາະຕ້ອງການຕູ້ແຊີແຊງ ຫຼື ຖັງໄໝໂຕຣເຈນ. ການເກັບໃນຕູ້ແຊີແຊງ
 ເຂົ້າກັນໄດ້ຢ່າງສົມບູນກັບການກວດຫາພະຍາດດ້ວຍເຄື່ອງມືໂມເລກຸນ
 ໂດຍບໍ່ສູນເສຍຄວາມໄວໃນການກວດ,
 ຖ້າຕ້ອງການເກັບຮັກສາໃນໄລຍະຍາວເພື່ອ ການກວດຫາ ແລະ
 ປູກການແຍກໄວຣັສ RNA ຕ້ອງການແຊີແຊງທີ່ -80°C ຫຼື
 ໄໝໂຕຣເຈນ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ການແຊີແຊງຕົວຢ່າງ
 ບໍ່ອະນຸຍາດໃຫ້ແຍກ *Leishmania*
 ດ້ວຍການຜ່າຕັດລະບົບຍ່ອຍອາຫານ,

ຍົກເວັ້ນກໍລະນີຈຸນິມໃນອາຍເປັນຂອງໄນໂຕຣເຈນ ກ່ອນ ແລະ ຫຼັງຈາກນັ້ນໃສ່ນໍ້າໄນໂຕຣເຈນ (ເຊັ່ນ: ໃສ່ຫຼອດໃນຖົງ) ເພື່ອການເກັບເຊື້ອ *Leishmania* ດ້ວຍຄວາມເຢັນ.

3.2. ການເກັບຮັກສາໃນເຫຼົ້າເອທານອນ (ethanol ຫຼື isopropyl alcohol)

ອາດເປັນວິທີທີ່ນໍາໃຊ້ກວ້າງຂວາງທີ່ສຸດສໍາລັບການເກັບຮັກສາຝ່ອຍຊາຍ. ງ່າຍຕໍ່ການປະຕິບັດໃນພາກສະໜາມ ເຖິງແມ່ນວ່າໃນເງື່ອນໄຂທີ່ຍາກລໍາບາກ ໂດຍບໍ່ຕ້ອງເຂົ້າຫ້ອງທົດລອງ. ການຮັກສາໃນເອທານອນ ເໝາະສົມສໍາລັບການສຶກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງ ເພາະອະໄວຍະວະອ່ອນ (ປົກ, ຂາ, ໜວດ, ຫຼື ພາກສ່ວນປາກ) ຍັງຄົງສະພາບເຕັມຖ້າບໍ່ມີຟອງອາກາດໃນຫຼອດ. ດັ່ງນັ້ນ ພວກເຮົາແນະນໍາໃຫ້ປິດຫຼອດດ້ວຍກ້ອນຝ້າຍນ້ອຍເພື່ອກໍາຈັດຟອງອາກາດ ແລະ ວາງປາຍຢູ່ໃກ້ຝ້າຍ (ຮູບທີ 1). ຄວາມເຂັ້ມຂຸນຂອງເອທານອນທີ່ເໝາະສົມ ຍັງມີການຖືກຖຽງກັນຢູ່. ທົ່ວໄປ ຄວາມເຂັ້ມຕໍ່າກວ່າ 70% ແມ່ນບໍ່ແນະນໍາ [45, 66]. ຄວາມເຂັ້ມຂຸນສູງກວ່າ ຮັກສາ DNA ໄດ້ດີກວ່າ ແລະ ຍາວນານຂຶ້ນ ແຕ່ເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງບອບບາງ ແລະ ແຕກຫັກງ່າຍສໍາລັບການສຶກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງ. ການໃຊ້ 96% ethanol (azeotrope mixture) ຮັບປະກັນຄວາມເຂັ້ມຂຸນທີ່ສະຖຽນຕາມໄລຍະເວລາ ໂດຍສະເພາະໃນພື້ນທີ່ຊົມຊື່ນເຊັ່ນປະເທດຮ້ອນ, ແຕ່ໃຫ້ 95% ethanol ມັກຫາໄດ້ງ່າຍກວ່າ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ, DNA ຖືກຮັກສາໄດ້ດີໃນເອທານອນ (ບໍ່ດີເທົ່າກັບການແຊີແຊງ ໂດຍສະເພາະສໍາລັບວິທີໂມເລກຸນແບບ NGS). ໂປຣຕີນ ມີຄວາມສະຖຽນຫນ້ອຍກວ່າຫຼາຍ ໂດຍສະເພາະສໍາລັບ proteomics ເຊັ່ນ MALDI-ToF. ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ເກັບໃນເອທານອນ ເປັນເວລາສອງສາມເດືອນ ຍັງສາມາດຈໍາແນກຊະນິດດ້ວຍລັກສະນະຮູບຮ່າງໄດ້, ແຕ່ບໍ່ສາມາດສ້າງສະເປັກຕະຣໍມຂອງໂປຣຕີນໄດ້. ການເກັບໃນເອທານອນ ຫຼື ແຫງ ສາມາດເພີ່ມປະສິດທິພາບໄດ້ ຖ້າແຊີແຊງຕົວຢ່າງທີ່ -20°C ເພີ່ມເຕີມ. ການແຊີແຊງທີ່ -20°C ຊ່ວຍເພີ່ມການຮັກສາໂມເລກຸນ (ເຊັ່ນ: ກົດນິວເຄລິກ) ໂດຍຊະລໍາການແຕກສະຫຼາຍຂອງໂມເລກຸນ ແລະ ຍັງມີປະໂຫຍດທີ່ສອງຕໍ່ການຮັກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງ ໂດຍຫຼຸດການທໍາລາຍເນື້ອເຍື່ອຕາມການເວລາ ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ ຜົນຕໍ່ຮູບຮ່າງມີຫນ້ອຍກວ່າຜົນຕໍ່ຄວາມສະຖຽນຂອງໂມເລກຸນ. ການເກັບໃນເອທານອນ ຍັງນໍາໃຊ້ໄດ້ສໍາລັບການຊອກຫາ DNA ແລະ RNA virus ເມື່ອໃຊ້ເອທານອນຄວາມເຂັ້ມຢ່າງຫນ້ອຍ 70% ໃນໄລຍະເກັບຮັກສາສິ້ນ ບໍ່ເກີນໜຶ່ງຫາສອງເດືອນ. ນອກຈາກນີ້, isopropyl alcohol ອາດຫາໄດ້ງ່າຍໃນບາງປະເທດ ແລະ ຮັກສາ DNA ໄດ້, ແຕ່ເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງແຂງກອບ ມັນບໍ່ເປັນໄຟໄດ້ເຊັ່ນ ethanol ດັ່ງນັ້ນຈຶ່ງຂຶ້ນສິ່ງງ່າຍ. ຖ້າຈໍາເປັນ, ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ເກັບໃນນໍ້າໄນໂຕຣເຈນ ຫຼື ແຊງແຊງແຫຼງ ສາມາດຍ້າຍໄປເກັບໃນເອທານອນ ເພື່ອປະສົມຂໍ້ເສຍຂອງທັງສອງວິທີ.



ຮູບທີ 1: ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຮັກສາໄວ້ໃນເຫຼົ້າເອທານອນ.

3.3. ການເກັບຮັກສາໃນນໍ້າຢາຮັກສາສະພາບ RNA (RNASS)

ນໍ້າຢານີ້ເປັນສານນໍ້າ ທີ່ຖືກນໍາໃຊ້ກວ້າງຂວາງ, ບໍ່ເປັນພິດ, ແລະ ອອກແບບມາເພື່ອຄົງສະພາບ ແລະ ປົກປ້ອງ RNA ໃນຕົວຢ່າງເນື້ອເຍື່ອ ແລະ ຕົວຢ່າງຈຸລັງ. ມັນເຮັດວຽກໂດຍການເຂົ້າໄປໃນຕົວຢ່າງຢ່າງໄວວາ ແລະ ປິດກັນ RNases (ເອນໄຊທີ່ທໍາລາຍ RNA), ດັ່ງນັ້ນ ຈຶ່ງປ້ອງກັນການແຕກສະຫຼາຍຂອງ RNA ໂດຍບໍ່ຕ້ອງແຊງແຊງທັນທີ. ການເກັບໃນ RNASS ປົກກະຕິມີປະສິດທິພາບໃນການຮັກສາຮູບຮ່າງຂອງເນື້ອເຍື່ອ ແລະ ຈຸລັງ ສໍາລັບການວິເຄາະທາງການຮູບຮ່າງຕໍ່ໄປ. ເຖິງແມ່ນວ່າ RNASS ຖືກສ້າງມາສໍາລັບການຄົງສະພາບຂອງໂຄງສ້າງ ແລະ ການເກັບຮັກສາໄລຍະສັ້ນເຖິງປານກາງໄດ້ດີ, RNASS ສາມາດເກັບຕົວຢ່າງໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງໄດ້ເຖິງ 7 ວັນ, ທີ່ 4°C ເປັນເວລາຫຼາຍອາທິດ, ຫຼື ທີ່ -20°C/-80°C ເພື່ອການຮັກສາໃນໄລຍະຍາວ. ວິທີນີ້ມີຄຸນຄ່າໂດຍສະເພາະໃນການເຮັດວຽກໃນພາກສະໜາມ ຫຼື ໃນຄລິນິກ ທີ່ບໍ່ມີລະບົບເຄື່ອງເກັບຄວາມເຢັນ. ການສະກັດ RNA ປົກກະຕິແມ່ນຕ້ອງເອົາຕົວຢ່າງອອກຈາກນໍ້າຢາ ແລະ ສາມາດດໍາເນີນການຕາມໂປຣໂຕຄອນມາດຕະຖານ.

3.4. ການເກັບຮັກສາແຫງໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງ

ນີ້ເປັນວິທີເກົ່າ ທີ່ນໍາໃຊ້ກັບຕົວຢ່າງທັງໝົດໂຕ (mounted whole), ມີຂໍ້ເສຍຫຼັກຄືຮັກສາອະໄວຍະວະອ່ອນໄວເຊັ່ນ ປົກ, ຂາ, ໜວດ, ແລະ ພາກສ່ວນປາກ ບໍ່ດີ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ, ການສຶກສາທາງໂປຣຕີນ ດ້ວຍ MALDI-ToF ຍັງສາມາດເຮັດໄດ້ຖ້າໃຊ້ສານປະເພດ silica gel ເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງແຫຼງ. ໃນທາງກົງກັນຂ້າມ, ການວິເຄາະທາງໂມເລກຸນທີ່ມີເປົ້າໝາຍ DNA ແມ່ນຍາກທີ່ຈະສຶກສາຕໍ່ກັບຕົວຢ່າງເຫຼົ່ານີ້, ເພາະ DNA ມັກຖືກຍອຍສະຫຼາຍ ແລະ ມີປະລິມານຕໍ່າ, ເຮັດໃຫ້ການວິເຄາະຍາກກວ່າກັບຕົວຢ່າງສິດ ຫຼື ແຊງແຊງ, ໂດຍສະເພາະສໍາລັບ ພັນທຸກໍາໃນແຖນຈຸລັງ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ,

ເຕັກນິກລ່າສຸດເຊັ່ນ **museomics** ສາມາດນຳໃຊ້ກັບຕົວຢ່າງໃນການເກັບປະເພດນີ້ [34]. ສະນັ້ນ, ວິທີເກັບແບບນີ້ແມ່ນບໍ່ແນະນຳ ຍົກເວັ້ນກໍລະນີບໍ່ມີທາງເລືອກອື່ນ. ສາມາດປະສົມກັບການເກັບໃນຄວາມເຢັນໂດຍຮັກສາຫຼອດຕົວຢ່າງໃນຕູ້ແຊຊ໌ທີ່ -20°C ຫຼື -80°C , ແຕ່ບັນຫາຫຼັກກໍຄືການນຳມາແຕ່ງສະໄລຕົວຢ່າງທີ່ຖືກຕ້ອງ ຫຼື ສ່ວນຕ່າງໆຂອງຮ່າງກາຍທີ່ຈຳເປັນສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດແມ່ນມີຄວາມຫຍຸ້ງຍາກ. ເພື່ອເຮັດໂດຍ, ການເຕີມນ້ຳ (rehydration) ແມ່ນມີຄວາມຈຳເປັນ, ພວກເຮົາແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ນ້ຳຢາ Triton X-100 ສຳລັບການເຕີມນ້ຳ ໄລຍະເວລາໃນການເຕີມນ້ຳແມ່ນແຕກຕ່າງກັນ ແຕ່ສອງສາມຊົ່ວໂມງຫາເປັນຫຼາຍວັນ, ຕ້ອງໄດ້ຕິດຕາມຢ່າງໃກ້ຊິດ. ຫຼັງຈາກເຕີມນ້ຳສົມບູນ, ຕົວຢ່າງຄວນລ້າງດ້ວຍນ້ຳ 3 ເທື່ອຕິດຕໍ່ກັນ.

3.5. ການເກັບຮັກສາໃນເຈຍກັນຕອງ

ຂໍ້ດີຫຼັກຂອງເຈຍກັນຕອງຄືຮັກສາຄວາມສະຖຽນຂອງ DNA ໃນຈຸລັງທີ່ບໍ່ໄດ້ຮັບການຄົງສະພາບ ແລະ ເຮັດໃຫ້ແຕ່ງ ຫຼື ຈຸລັງເມັດເລືອດທີ່ເກັບໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງ. ເຈຍກອງມີຂະໜາດນ້ອຍ, ສາມາດເກັບຫຼາຍຮ້ອຍຕົວຢ່າງໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງ ໃນບໍລິມາດຂະໜາດຂອງໂຕະນ້ອຍໆ. ໃນເຈຍກອງແມ່ນຖືກຍ້ອມດ້ວຍສານທີ່ໃຊ້ອະເສີມທີ່ກໍ່ໃຫ້ເກີດພະຍາດຕິດຕໍ່, ດັ່ງນັ້ນ ຕົວຢ່າງບໍ່ຖືກນັບວ່າເປັນຄວາມສ່ຽງທາງຊີວະພາບ (biohazard) ເຊິ່ງເຮັດໃຫ້ການເກັບຮັກສາ ແລະ ຂົນສົ່ງຕົວຢ່າງໂດຍບໍ່ຕ້ອງມີມາດຕະການປ້ອງກັນຄວາມສ່ຽງທາງຊີວະພາບພິເສດ [68].

4. ການຜ່າຕັດຕົວຢ່າງ

ຕ່າງຈາກແມ່ງຫຼາຍຊະນິດທີ່ຖືກຈຳແນກຊະນິດດ້ວຍລັກສະນະພາຍນອກທີ່ສາມາດສັງເກດເຫັນໄດ້ໃນຕົວຢ່າງແມ່ງໄມ້ທີ່ຕິດເປັນຕົວທັງໝົດ (pinned in toto), ຮີນຝ່ອຍຊາຍ ຕ້ອງການການຜ່າຕັດ ແລະ ການແຕ່ງໃສ່ແຜ່ນແກ້ວສະໄລ ເພື່ອສຶກສາລັກສະນະທາງກາຍະວິທະຍາສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດທີ່ຖືກຕ້ອງ. ເຖິງຈະເລືອກຂັ້ນຕອນກະກຽມ ແລະ ການແຕ່ງສະໄລແນວໃດກໍຕາມ, ການຜ່າຕັດແມ່ນໃຊ້ເຕັກນິກດຽວກັນ (ຮູບທີ 2 ແລະ 3) (<https://zenodo.org/records/18198006>).

aqueous solution)

ເປັນທີ່ສັງເກດວ່າການແຕ່ງສະໄລແມ່ນກ່ຽວພັນກັບຕົວຢ່າງຍັງສິດທີ່ຈັບໃໝ່ ຫຼື ເກັບຮັກສາໄວ້ໄດ້ດີ. ນັກເກັບຕົວຢ່າງສ່ວນໃຫຍ່ແມ່ນມີຕົວຢ່າງທີ່ເກັບແຕ່ງ (ທີ່ສຳລັບການໃຊ້ MALDI-ToF) ຫຼື ເກັບໃນເຫຼົ້າເອທານອນເປັນເວລາຫຼາຍປີ. ແຕ່ໜ້າເສຍດາຍທີ່ການເກັບຕົວຢ່າງໃນເຫຼົ້າເອທານອນທີ່ບໍ່ເໝາະສົມໃນໄລຍະເວລາຫຼາຍປີ, ແລະ ການຮັກສາຕົວຢ່າງແມ່ງໄມ້ຂາຂໍອື່ນໆທີ່ເກັບແບບນີ້ ຈະກາຍເປັນຂໍ້ຫຍຸ້ງຍາກຫຼາຍຕໍ່ການກະກຽມສຳລັບການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ. ເຫດການທີ່ເກີດຂຶ້ນ ແລະ ມັກພົບເລື້ອຍໆ ແມ່ນການເລື່ອມສະພາບຄວາມຍືດຍຸ່ນຂອງຕົວຢ່າງ, ຕາມດ້ວຍການລະເຫີຍຂອງເຫຼົ້າເອທານອນ. ໃນທັງສອງກໍລະນີ, ພວກເຮົາບໍ່ມີທາງເລືອກ

ເພາະຕົວຢ່າງຢູ່ໃນເຫຼົ້າເອທານອນເປັນເວລາດົນເກີນໄປ ຫຼື ແຕ່ງ. ດັ່ງນັ້ນ ຈຶ່ງເກີດແນວຄວາມຄິດໃຊ້ນ້ຳຢາເຕີມນ້ຳ (wetting agents) ທີ່ບໍ່ແມ່ນນ້ຳຢາຊັກຟອກທີ່ແຮງ. Triton X100 ເປັນນ້ຳຢານ້ຳບໍ່ມີໄອອອນ (4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol solution, ຫຼື t-octylphenoxy polyethoxyethanol, polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), ຖືກນຳໃຊ້ກວ້າງຂວາງເປັນນ້ຳຢາຊັກຟອກໃນການສຶກສາຈຸລັງ ແລະ ຊີວະໂມເລກຸນ ມັນຊ່ວຍເຮັດໃຫ້ເຍື່ອຫຸ້ມຈຸລັງ ແລະ ເຍື່ອຫຸ້ມແກ່ນຈຸລັງ ສາມາດຊຶມຜ່ານໄດ້ (permeabilization).

ຂັ້ນຕອນການໃຊ້ Triton X100 ທີ່ບໍ່ມີໄອອອນໃນນ້ຳຢາ 0.5% ມີດັ່ງນີ້:

- ເອົາເຫຼົ້າເອທານອນບໍລິສຸດໃສ່ໃນຕົວຢ່າງແຕ່ງ;
- ຕື່ມປະລິມານ Triton X100 0.5% ທີ່ຈາເປັນເພື່ອໃຫ້ຕົວຢ່າງຈົມລົງຈົນໝົດ;
- ປະໄວ້ໃຫ້ມີການດຳເນີນການປະສົມກັນໄປເປັນເວລາປະມານ 5 ນາທີ ຫາ ຫຼາຍວັນ, ຕິດຕາມຢ່າງເປັນປະຈຳ. ຕົວຢ່າງແມ່ງໄມ້ຂາຂໍທັງໝົດຕ້ອງແຍກອອກຈາກກັນໄດ້ຢ່າງສົມບູນໃນນ້ຳຢາ;
- ເອົານ້ຳຢາ Triton X100 ອອກ ແລະ ແທນດ້ວຍນ້ຳຢາ potassium hydroxide.

4.1. ຫົວ (Head)

ການຜ່າຕັດສາມາດດຳເນີນການໄດ້ໂດຍໃຊ້ເຂັ້ມນ້ອຍໆ ຫຼື ເຂັ້ມແມ່ງໄມ້ (entomological pins) ພາຍໃຕ້ກ້ອງສະເຕຣີໂອ (stereomicroscope) (ຮູບທີ 2 ແລະ 3). ເຂັ້ມທີ່ນຳໃຊ້ທົ່ວໄປປະກອບມີຂະໜາດ: 26G x 1/2" (0.45 x 13 mm), 30G x 1/2" (0.3 x 13 mm), ຫຼື 25G x 5/8" (0.5 x 16 mm). ເພື່ອກະກຽມຕົວຢ່າງສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດ, ຢ່າງໜ້ອຍຕ້ອງແຍກຫົວອອກຈາກຮ່າງກາຍ ແລະ ແຕ່ງສະໄລດ້ານລຸ່ມຂຶ້ນເທິງ (ventral side up) ເພື່ອສະແດງຜິ່ງປາກ (cibarium) ແລະ ຜິ່ງຄໍ (pharynx), ໃນຂະນະທີ່ ເອິກ (thorax) ແລະ ທ້ອງ (abdomen) ແມ່ນແຕ່ງສະໄລດ້ານຂ້າງ (laterally) ຫຼັງການຜ່າຕັດ. ການແຕ່ງສະໄລຫົວໃນແບບໜ້າ-ຫຼັງ (ventro-dorsal) ແມ່ນເພື່ອຮັບປະກັນວ່າຫົວດ້ານ occipital foramen ຊຶ່ງຂຶ້ນເທິງ, ເຮັດໃຫ້ cibarium ສາມາດສັງເກດເບິ່ງໄດ້ໂດຍກົງ. ການເຂົ້າເຖິງລັກສະນະກາຍວິທະຍາເຫຼົ່ານີ້ ຈະງ່າຍຂຶ້ນ ຖ້າຫົວຖືກຕັດແຍກອອກຈາກຮ່າງກາຍຢ່າງສົມບູນ.

ການໃຊ້ນ້ຳ Triton X100: ນ້ຳຢານ້ຳບໍ່ມີໄອອອນ (non-ionic)

4.2. ປີກ ແລະ ເອິກ (thorax)

ປີກຕ້ອງແຕ່ງສະໄລໃຫ້ແຜ່ອອກແບບຮາບພຽງ ປີກແຕ່ງສະໄລສາມາດຕັດແຍກອອກທີ່ກົກປີກ ແລະ ແຕ່ງສະໄລແຍກກັນ, ຫຼື ແຕ່ງສະໄລປີກຂ້າງໜຶ່ງແຍກ ແລະ ອີກຂ້າງໜຶ່ງຍັງຕິດກັບເອິກ. ຖ້າມີແຜນການວິເຄາະທາງເລຂາຄະນິດ (geometric morphometry), ຈຳເປັນຕ້ອງລະບຸ ແລະ ໝາຍປາຍລະຫັດປີກຂວາ ແລະ ຊ້າຍໃຫ້ຖືກຕ້ອງກ່ອນແຕ່ງສະໄລ. ເອິກແບ່ງອອກເປັນຫຼາຍສ່ວນ ແລະ ແຕ່ງສະໄລສ່ວນມີຂໍ້ມູນທາງອານາໄມວິຖານ (taxonomy)ທີ່ສາຄັນຫຼາຍ [20, 64]. ໂດຍທົ່ວໄປແຕ່ງສະໄລເອິກໃນແບບດ້ານຂ້າງ (lateral view) ເພື່ອສັງເກດເບິ່ງຂົນ chetotaxy ແລະ ການກະຈາຍສີ. ການມີຮູຂອງຂົນໃນບາງພື້ນທີ່ຂອງເອິກສາມາດໃຊ້ໃນການຈຳແນກຊະນິດຂອງບາງຊະນິດໃນ ສະກຸນ (genus) *Brumptomyia*. ການກະຈາຍສີ ອາດໃຊ້ແຍກ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ໃນ Neotropical ທີ່ລະດັບ ສະກຸນ (ເຊັ່ນ *Bichromomyia*), series ຊະນິດ (ເຊັ່ນ *Pintomyia*), ຫຼື ແມ່ແຕ່ງຊະນິດໃນ ສະກຸນ ດຽວກັນ (ເຊັ່ນ *Micropygomyia*, *Nyssomyia*, *Psathyromyia*, ແລະ *Psychodopygus*) [20]. ດັ່ງນັ້ນ ຖ້າ ເອິກ ບໍ່ໃຊ້ສຳລັບການວິເຄາະດ້ານໂມເລກຸນ, ຄວນແຕ່ງສະໄລບໍ່ໃຫ້ເສຍຫາຍ. ສຳຄັນກວ່ານັ້ນ, ບໍ່ແມ່ນຄວາມເຂັ້ມຂອງສີ ແຕ່ເປັນການກະຈາຍຂອງສີຕາມເອິກ. ດັ່ງນັ້ນ ຂັ້ນຕອນການເຮັດໃຫ້ໂປຼງໃສຈະຕ້ອງບໍ່ທຳລາຍສີ ຫຼື ຮູບແບບສີຂອງມັນ.



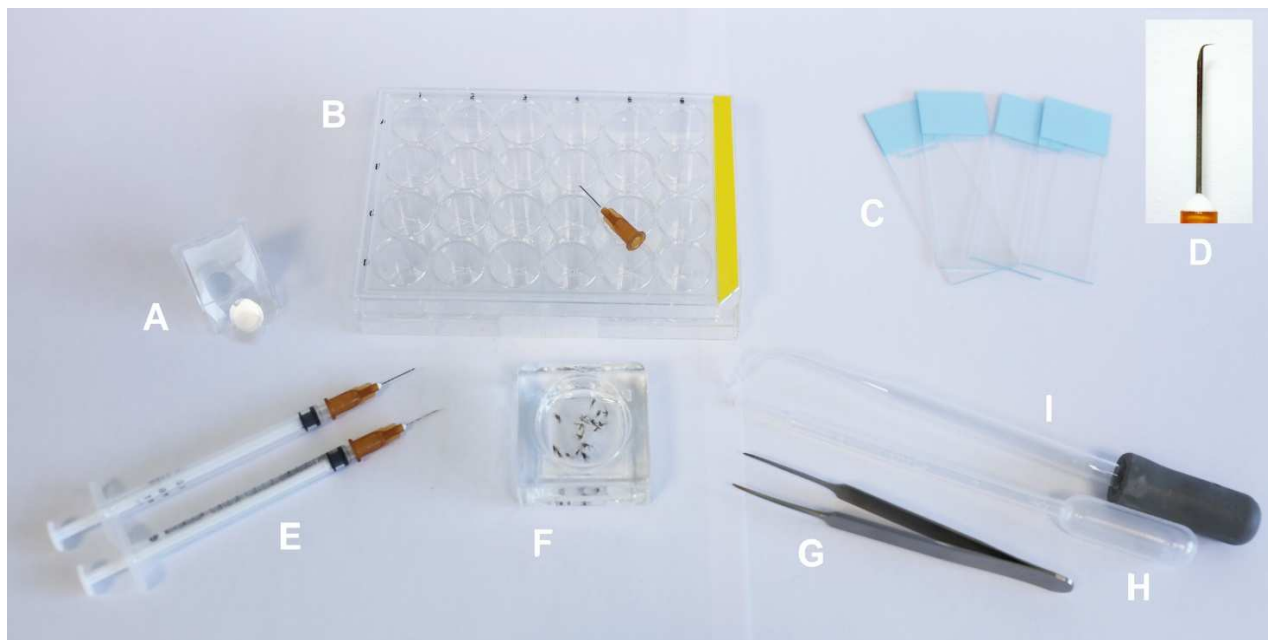
ຮູບທີ 3: ແຜ່ນ 24 ຊຸມ, ເຊິ່ງແຕ່ງລະຊຸມມີຫົວ ແລະ ປາຍທ້ອງຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ.

4.3. ອະໄວຍະວະສືບພັນ (Genitalia)

ຕ້ອງປະຕິບັດດ້ວຍຄວາມລະມັດລະວັງເປັນພິເສດເມື່ອແຕ່ງສະໄລ ອະໄວຍະວະສືບພັນທັງໃນຕົວຜູ້ ແລະ ຕົວແມ່, ເພາະມັນສຳຄັນຕໍ່ການຈຳແນກ ສະກຸນ (genus), ສະກຸນຍ່ອຍ (subgenus), ແລະ ຊະນິດ (species). ໃນທັງສອງເພດ ອະໄວຍະວະສືບພັນມີເປັນຄູ່.

4.3.1. ຕົວຜູ້ (Males)

ອະໄວຍະວະສືບພັນພາຍນອກ ແລະ ປະກອບດ້ວຍ forceps ຄູ, ແຕ່ງລະອັນເປັນ gonocoxite-gonostyle articulation ທີ່ດ້ານເທິງ ແລະ epandrial lobe ດ້ານລຸ່ມ. Gonostyle ມີ spines ແລະ ບາງຄັ້ງຂົນ setae, ຕ້ອງນັບໄດ້ ແລະ ເບິ່ງຕຳແໜ່ງການຕິດໄດ້ຊັດເຈນ.



ຮູບທີ 2: ອຸປະກອນທີ່ຕ້ອງການສຳລັບການແຕ່ງສະໄລ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ: A: ແຜ່ນປີກແກຼວມິນ (ເສັ້ນຜ່ານກາງ 10 ຫຼື 12 mm); B: ແຜ່ນ 24 ຊຸມ ແລະ ເຂັ້ມມີຫົວ (ຖ້າໃຊ້ນ້ຳມັນ clove oil ຫຼື Euparal® essence ເພື່ອແຕ່ງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ຢາໃຊ້ແຜ່ນອະຄຣິລິກເພາະຈະເກີດປະຕິກິລິຍາທາງເຄມີ ແລະ ຕົວຢ່າງຈະເສຍຫາຍ); C: ແຜ່ນແກຼວທີ່ເໝາະສົມສຳລັບຕິດລະຫັດ; D: ລາຍລະອຽດຂອງເຂັ້ມມີປາຍຂໍ; E: ເຂັ້ມຕິດກັບດ້າມຊະລິງ; F: ແກຼວ ຫຼື ພາຊະນະທຽບເທົ່າທີ່ໃຊ້ວາງຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຈະແຕ່ງສະໄລ; G: ຄິບ Dumont; H: ປີແປ້ດດູດແບບພາດສະຕິກ; I: ປາຍແກຼວທີ່ງົດດ້ວຍການໃຊ້ຄວາມຮ້ອນເພື່ອປຸງນ້ຳຢາໃສ່ຮູ່ງ່າຍຂັ້ນ.

ສໍາຄັນແມ່ນຕ້ອງສັງເກດດ້ານໃນກອງ gonocoxite, ເຊິ່ງອາດມີ tuft ຂອງ sessile setae ຫຼື ຕິດກັບ lobe (= tubercle) [22]. ຜູ້ທີ່ມີປະສົບການໜ້ອຍອາດແຕ່ງສະໄລດ້ານຂ້າງ lateral ງ່າຍໆ ໂດຍບໍ່ແຍກອະໄວຍະວະສືບພັນອອກຈາກປາຍທ້ອງ (<https://zenodo.org/records/18311158>). ໃນກໍລະນີນີ້, ການທັບຊ້ອນກັນຂອງສອງສ່ວນ ອາດເຮັດໃຫ້ນັບ setae ດ້ານໃນ gonocoxite ຍາກ, ແຕ່ຢູ່ກັບການເສຍຫາຍອະໄວຍະວະສືບພັນເນື່ອງຈາກຜ່າຕັດຜິດພາດ

ຜູ້ມີປະສົບການອາດພະຍາຍາມເປີດອະໄວຍະວະສືບພັນເປັນສອງສ່ວນ ເພື່ອເຮັດໄດ້, ໃຊ້ດ້ານ bevel ຂອງເຂັມ (ປະເພດ intradermal reaction needle) ຜ່ານໄປ ໂດຍແຍກແຕ່ບໍ່ຕັດສົມບູນ ເພື່ອແຍກ gonocoxite-gonostyle (<https://zenodo.org/records/18311158>). ແບບນີ້ ການສັງເກດດ້ານໃນ ຈະງ່າຍຂຶ້ນ. ການແຕ່ງສະໄລນີ້ ຍັງຊ່ວຍເບິ່ງ parameres ແລະ parameral sheaths ໄດ້ງ່າຍ ເພາະບໍ່ທັບຊ້ອນກັນ.

ສໍາລັບການແຕ່ງສະໄລດ້ານຂ້າງທີ່ເຮັດໃຫ້ອະໄວຍະວະທັບຊ້ອນ, ຕົວຢ່າງຕ້ອງໄດ້ເຮັດໃຫ້ໃສ່ຢ່າງສົມບູນ.

4.3.2. ຕົວແມ່ (Females)

ອະໄວຍະວະສືບພັນເປັນພາຍໃນ, ປະກອບດ້ວຍຖົງເກັບນໍ້າເຊື້ອ spermathecae. ຖ້າບໍ່ຜ່າຕັດ, ຕ້ອງສັງເກດຜ່ານເກັດຫຼັງ (teguments) ແລະ ແຕ່ງສະໄລທ້ອງ ດ້ານລຸ່ມ (ventral position). ເຖິງຈະເລືອກ ນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລ (mounting medium) ແນວໃດກໍຕາມ, spermathecae ປົກກະຕິສາມາດສັງເກດເບິ່ງໄດ້ ໂດຍສະເພາະຖ້າບໍ່ແມ່ນ ກົງ (smooth) ແລະ ໃສ (cleared). ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ, ການສັງເກດ smooth, thin-walled spermathecae ອາດຍາກໃນ medium ທີ່ refractile ບໍ່ດີ. ນອກຈາກນີ້, ການສັງເກດ ພື້ນ (base) ຂອງທໍ່ spermathecal ducts ຈໍາເປັນສໍາລັບການຈໍາແນກຊະນິດ, ເຊັ່ນໃນ ສະກຸນຍ່ອຍ (subgenus) Larrousius [35, 37, 38], ພາຫະນໍາຫຼັກຂອງ Leishmania infantum ໃນ Old World. ຖ້າບໍ່ສັງເກດໄດ້, ການຈໍາແນກຕົວຢ່າງຈະເປັນໄປບໍ່ໄດ້. ເພື່ອແກ້ໄຂຄວາມຍາກນີ້, ຄວນແຍກ genital furca-spermathecae ອອກຈາກ abdomen (<https://zenodo.org/records/18311106>). Spermathecae ມັກຍາກສັງເກດໃນລະຫວ່າງຜ່າຕັດ, ແຕ່ genital furca ພົບງ່າຍກວ່າ. ເນື່ອງຈາກ spermathecal ducts ເປີດເຂົ້າ genital furca, ການແຍກ furca ນີ້ ປົກກະຕິອະນຸຍາດໃຫ້ແຍກ spermathecae ໄດ້. ຖ້າສັບສົນແລະຕັດ spermathecae ໂດຍບໍ່ຕັ້ງໃຈ, ມັນບໍ່ສູນເສຍ ແລະ ຍັງສາມາດສັງເກດໄດ້ໃນ teguments ຂອງ abdomen (ຮູບທີ 4).

4.4. ການຜ່າຕັດກະເພາະສໍາລັບການປຸກແຍກເຊື້ອ

Leishmania

ການຜ່າຕັດລະບົບຍ່ອຍອາຫານ ຈໍາເປັນສໍາລັບການກວດຫາ ແລະ ປຸກແຍກເຊື້ອ Leishmania ໃນ ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ຕົວແມ່. ຂັ້ນຕອນນີ້ດໍາເນີນໄດ້ທັງໃນພາກສະໜາມ ແລະ ພາຍໃນຫ້ອງທົດລອງ ເພື່ອປະເມີນຄວາມສາມາດໃນການເປັນພາຫະ vectorial competence ຂອງຮິນ. ແນະນໍາໃຫ້ເຮັດກັບຕົວແມ່ທີ່ເຮັດໃຫ້ຕາຍໃໝ່. ລ້າງຕົວແມ່ດ້ວຍນໍ້າ ຫຼື saline solution ທີ່ມີຄວາມເປັນນໍ້າຢາຊັກຟອກອ່ອນໆ ເພື່ອກໍາຈັດຂົນ. ຂັ້ນຕອນນີ້ຊ່ວຍຮັກສາຄວາມອະນາໄມສໍາລັບການແຍກ Leishmania, ໃນຂະນະທີ່ຮັກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງທີ່ຈໍາເປັນສໍາລັບການຈໍາແນກ. ເພື່ອຊອກຫາ ແລະ ປຸກແຍກເຊື້ອ Leishmania, ແຍກກະເພາະ

midgut ອອກຢ່າງລະມັດລະວັງ ແລະ ໃສໃນນໍ້າຫຍິດດຽວຂອງ sterile saline solution (0.9% NaCl). ຫຼັງຈາກສັງເກດແມ່ກາຝາກ parasites ທີ່ເຄື່ອນໄຫວດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ (magnification ປະມານ 200x), ໃຊ້ insulin syringe ຫຼື micropipette ຖ່າຍໄປໃນພູມປຸກ cultivation medium (ລາຍລະອຽດເພີ່ມເຕີມເບິ່ງບົດທີ 4.4.3).

ແຕ່ງສະໄລຫົວ ແລະ ອະໄວຍະວະສືບພັນໂດຍກົງໃນນໍ້າຢາ Marc-André ເພື່ອເຮັດໃຫ້ໂປ່ງໃສ. ສໍາຄັນ: ຫ້າມໃຫ້ນໍ້າ Marc-André ສໍາຜັດກັບ Leishmania – ບໍ່ວ່າຈະໂດຍກົງ ຫຼື ຜ່ານເຄື່ອງມື ຫຼື ເຂັມ – ເພາະມັນທໍາລາຍແມ່ກາຝາກ parasites.

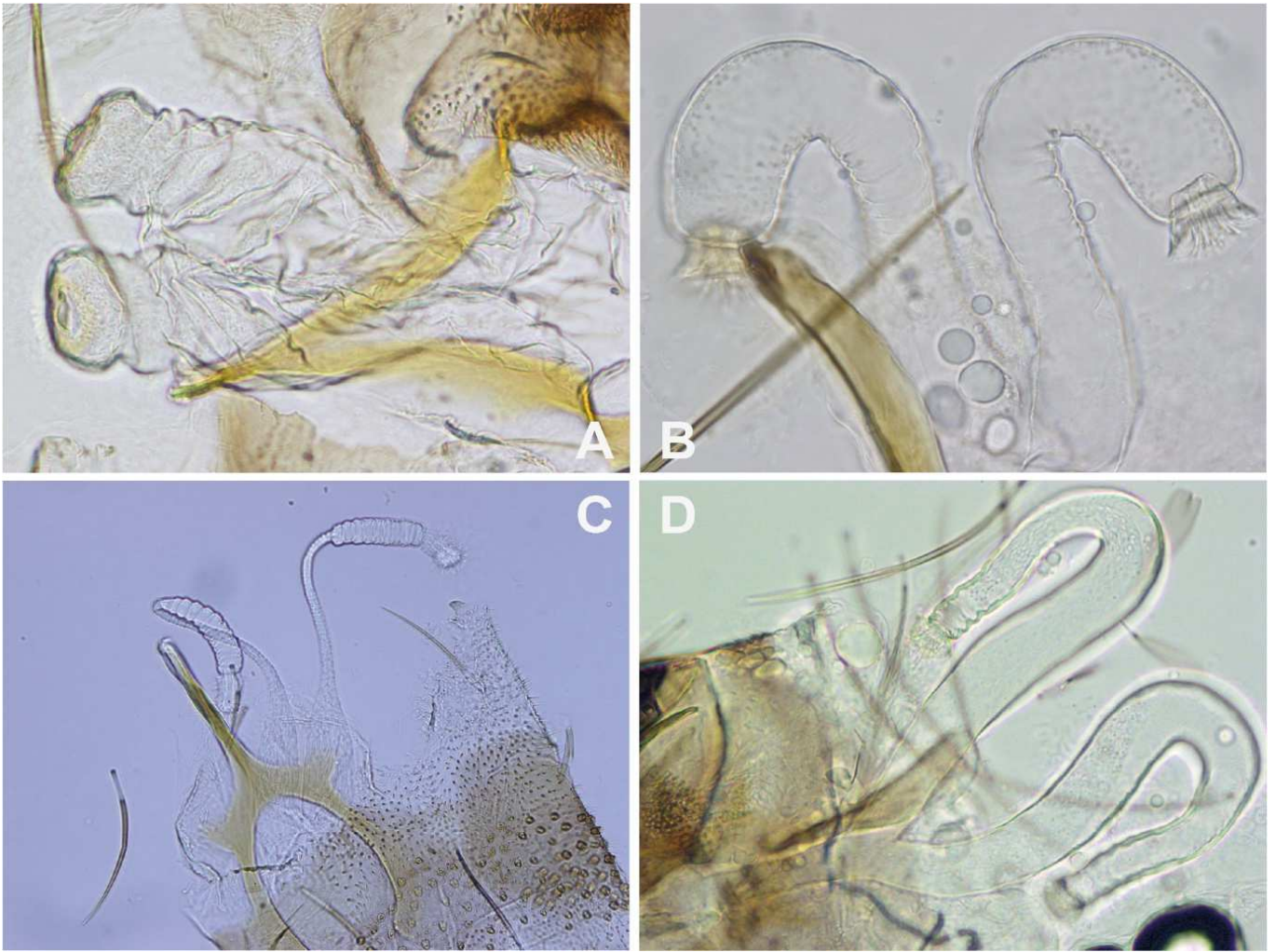
ການຜ່າຕັດ ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ຕົວແມ່ ສາມາດເຮັດໃນແຜ່ນສະໄລແຜ່ນດຽວ ຫຼື ສອງແຜ່ນ; ທັງສອງວິທີມີຂໍ້ດີ ແລະ ຂໍ້ຈໍາກັດ (ຮູບທີ 5; <https://zenodo.org/records/18311154>).

4.4.1. ວິທີໃຊ້ໃນຜົນສະໄລສອງແຜ່ນ

ວິທີທໍາອິດແມ່ນການໃຊ້ແຜ່ນແກ້ວສອງແຜ່ນແຍກກັນ: ແຜ່ນທີ່ໜຶ່ງແມ່ນມີນໍ້າກັນເພື່ອແຍກເຊື້ອຈາກກະເພາະລໍາໃສ່, ແຜ່ນອີກໜຶ່ງແມ່ນເພື່ອແຕ່ງສະໄລຫົວ ແລະ ຖົງເກັບນໍ້າເຊື້ອໃນນໍ້າຢາ Marc-André. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ, ໃນເງື່ອນໄຂໃນພາກສະໜາມ, ມັກມີ 2 ຫາ 3 ຄົນ ຜ່າຕັດຮິນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ ສົ່ງໄປໃຫ້ນັກຄົ້ນຄວ້າຄົນໜຶ່ງທີ່ຮັບຜິດຊອບການຈໍາແນກຊະນິດຮິນ ແລະ ອີກຄົນໜຶ່ງເພື່ອຊອກຫາເຊື້ອ Leishmania ໃນກະເພາະລໍາໃສ່. ການປະຕິບັດງານໂດຍໃຊ້ແຜ່ນແກ້ວສອງແຜ່ນ ອາດເຮັດໃຫ້ການຕິດຕາມຕົວຢ່າງຫຼຸ້ຍຢາກ ໂດຍສະເພາະ ການນໍາຫາແຜ່ນແກ້ວຂອງຊະນິດຮິນ ແລະ ແຜ່ນແກ້ວກະເພາະລໍາໃສ່ ຖ້າພົບພົບເຊື້ອ (<https://zenodo.org/records/18311154>).

4.4.2. ວິທີໃຊ້ໃນຜົນສະໄລແຜ່ນ ແຜ່ນດຽວ

ການໃຊ້ແຜ່ນສະໄລແຜ່ນດຽວ ແມ່ນຮັບປະກັນການຕິດຕາມຜົນ. ແຕ່ ເຖິງຢ່າງ ໃດກໍຕາມ, ຕ້ອງປະຕິບັດດ້ວຍຄວາມລະມັດລະວັງເພື່ອເພີ່ມ



ຮູບທີ 4: Spermathecae ທີ່ຜ່າຕັດ ແລະ ແຕງສະໄລໃນນ້ຳ Marc-André ຈາກຕົວຢ່າງສິດ. A: *Idiophlebotomus longiforceps* (ສ.ປ.ປ ລາວ); B: *Sergentomyia minuta* (France); C: *Phlebotomus ariasi* (France); D: *Sergentomyia anodontis* (ສ.ປ.ປ ລາວ).

ຄວາມອະເຊື້ອສູງສຸດໃນຂັ້ນຕອນນີ້, ຜູ້ດຳເນີນ ການຕ້ອງເຮັດຄວາມສະອາດມີດ້ວຍເຈວ hydroalcoholic ເປັນປະຈຳ. ຕ້ອງໃຊ້ແຜນສະໄລທີ່ບໍ່ແມ່ນ frosted ແລະ ແຜນປົກແບບສີຫຼຽມ (22 x 22 mm) ທີ່ທໍດ້ວຍແຜນ aluminium foil ແລະ ເຮັດໃຫ້ sterile ດ້ວຍຄວາມຮ້ອນ (ໃຊ້ເຕົ້າ Poupinel), ພ້ອມກັບເຂັມ sterile ໃໝ່ສໍາລັບການຜ່າຕັດແຕ່ລະຄັ້ງ (ແນະນຳ: 25G Ø 0.5mm x 16mm). ວາງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ໃນນ້ຳ sterile saline ກາງແຜນ. ຕັດຫົວອອກ, ຕັດລະຫວ່າງ tergites ແລະ sternites ຂອງທ້ອງ ຂໍ້ທີ 6 ແລະ 7 ໂດຍບໍ່ໃຫ້ຕັດລະບົບຍ່ອຍອາຫານ (ສາມາດຕັດສູງກວ່ານີ້ ຖ້າຄາດວ່າຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອຍາວຫຼາຍ). ຫຼັງຈາກນັ້ນ, ຍືດເອິກໄວ້ດ້ວຍເຂັມໜຶ່ງ, ແລະ ດຶງສ່ວນປາຍທ້ອງ ໄປທາງດ້ານຫຼັງດ້ວຍເຂັມອີກອັນໜຶ່ງເພື່ອດຶງລໍາໃສ່ອອກ. ຖ້າບໍ່ສໍາເລັດ, ອາດຍືດ ປາຍທ້ອງດ້ວຍເຂັມ ແລະ ດຶງລະບົບຍ່ອຍອາຫານຈາກສ່ວນໜ້າ. ຖ້າຍັງບໍ່ສໍາເລັດ, ຕ້ອງດຶງລໍາໃສ່ອອກໂດຍທໍາລາຍ tegument ທີ່ເຫຼືອຢູ່ຮອບມັນໃຫ້ຫຼາຍທີ່ສຸດ. ເມື່ອດຶງ ລໍາໃສ່ອອກໄດ້, ແຍກສ່ວນປາຍທ້ອງສຸດທ້າຍດ້ວຍການຕັດລະບົບຍ່ອຍ ອາຫານ. ໃສ່ລໍາໃສ່ໃນນ້ຳ sterile saline ໃໝ່ ທີ່ວາງໄວ້ຂ້າງໜຶ່ງຂອງແຜນ, ແລະ ປົກດ້ວຍແຜນປົກ sterile ຢ່າງຄ່ອຍໆ. ຍ້າຍຫົວ ແລະ

ສ່ວນປາຍທ້ອງສຸດທ້າຍໄປໃນນໍ້າແຕງສະໄລ Marc-André ນ້ອຍໆ ທີ່ວາງໄວ້ອີກປາຍໜຶ່ງຂອງແຜນ, ຮັບປະກັນບໍ່ສໍາຜັດກັບ Leishmania. ຈັດຫົວໃຫ້ຖືກຕ້ອງ (occipital foramen ຂຶ້ນເທິງ), ແລະ ແຍກ ຖົງເກັບນໍ້າເຊື້ອ ກັບ genital furca ຕາມທີ່ອະທິບາຍຂ້າງເທິງ ແລະ ປົກດ້ວຍແຜນປົກມົນນ້ອຍ (Ø 12 mm, ຢາສັບສົນກັບແຜນປົກສີຫຼຽມ sterile). ສ່ວນທີ່ເຫຼືອຂອງຮ່າງກາຍ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ ປົກ ຍັງຢູ່ໃນນໍ້າ saline ກາງແຜນ (<https://zenodo.org/records/18311154>). ໃນກໍລະນີໃຫ້ຜົນບວກ, ຫຼື ສໍາລັບການສຶກສາ ການຈຳແນກຊະນິດ, ເອິກ ແລະ ທ້ອງ ສາມາດເກັບຮັກສາໄວ້ສໍາລັບການວິເຄາະໂມເລກູນ ຫຼື proteomic, ແລະ ປົກ ສາມາດແຕງສະໄລໃນນໍ້າຢາທີ່ເປັນນໍ້າ. ເພື່ອຮັກສາການແຕງສະໄລ, ປະລິມານເພີ່ມເຕີມຂອງນໍ້າ Marc-André ສາມາດປຸງແທນດ້ວຍ ນໍ້າຢາແຕງສະໄລ ທີ່ເປັນ medium ນໍ້າ ເຊັ່ນ ກໍາ chloral (=Hoyer) ຫຼື medium ອີງໂຟລີວິນິນ ອາລຄອຣອນ. ວິດີໂອລະອຽດທີ່ສະແດງຂັ້ນຕອນເຫຼົ່ານີ້ມີໃຫ້ເບິ່ງ (ການຜ່າຕັດກະເພາະລໍາໃສ່ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ: <https://zenodo.org/records/18303014> ແລະ ການຜ່າຕັດຕໍ່ອມນໍ້າລາຍຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ:

<https://zenodo.org/records/18302850>), ດັ່ງນັ້ນ ຈຶ່ງບໍ່ອະທິບາຍຊື່ໃນທີ່ນີ້.

4.4.3. ການແຍກ ແລະ ປຸກ *Leishmania* ຈາກກະເພາະລຳໃສ່ຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ

ການແຍກແມ່ກາຝາກຈາກການຜ່າຕັດ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍໃນຕົວແມ່ທີ່ຕິດເຊື້ອ ເປັນຂັ້ນຕອນທີ່ລະອຽດອ່ອນ ຕ້ອງການທັກສະສູງ ແລະ ຄວນເລີ່ມຝຶກກັບຕົວຢ່າງທີ່ບໍ່ມີແມ່ກາຝາກກ່ອນ. ຫຼັງການຜ່າຕັດ, ຍ້າຍເອົາລຳໃສ່ໄປໃສ່ໃນນ້ຳເກືອທີ່ອະເຊື້ອໃໝ່ (NSS 0.9 %) ຫຼື Locke's solution ເພື່ອລ້າງ [4]. ລຳໃສ່ທີ່ຜ່າຕັດແລ້ວສາມາດດຳເນີນໂດຍສອງວິທີ: i) ສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດເພື່ອເບິ່ງໄລຍະຕ່າງໆຂອງ *Leishmania* promastigotes ແລະ ຕຳແໜ່ງບ່ອນຢູ່ຂອງພວກມັນ, ໂດຍເນັ້ນເບິ່ງວາວປິດທາງເປີດກະເພາະ stomodeal valve, ແລະ ii) ເປີດລຳໃສ່ເພື່ອໃຫ້ promastigotes ອອກງ່າຍ ສຳລັບການປຸກເຊື້ອໃຫ້ໂດຍຈຳນວນຫຼາຍ [4]. ການພົບ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຕິດເຊື້ອ ມີໂອກາດໜ້ອຍຫລາຍໃນພາກສະໜາມ, ດັ່ງນັ້ນ ການຝຶກຫັດທີ່ດີ ຈະເພີ່ມໂອກາດ ຄວາມສຳເລັດໃນການປຸກແຍກເຊື້ອ. ຖ້າສັງເກດເຫັນ *Leishmania* parasites ໃນລຳໃສ່, ໃຫ້ໃຊ້ເຂັມໃໝ່ ແລະ ເພີ່ມນ້ຳເກືອທີ່ອະເຊື້ອນ້ອຍໆ ຮອບແຜ່ນປົກດ້ວຍວິທີ capillary action ເພື່ອປູອຍພວກມັນອອກ. ຕ້ອງລະມັດລະວັງ ແລະ ໄວ ໃນການຕັດລຳໃສ່ ເພື່ອປູອຍແມ່ກາຝາກອອກໃນນ້ຳເກືອ. ນຳໃຊ້ micropipette 100 µL ຫຼື tuberculin syringe ເພື່ອເກັບ parasites ແລະ ປຸກໃນ culture medium ທີ່ໝາຍລະຫັດທີ່ຖືກຕ້ອງ.

ການປຸກ *Leishmania* promastigotes ໃນແກ້ວທົດລອງ (in vitro): ແມ່ກາຝາກທີ່ແຍກໂດຍ ເລີ່ມເກັບຮັກສາໃນພູມປຸກ SNB-9 blood agar slopes ຫຼື ໃນ Novy, McNeal, Nicolle (NNN) solid medium [16] ທີ່ປົກດ້ວຍ alpha-MEM medium sterile [16, 65] ຫຼື M199 medium, ແຕ່ລະອັນຕື່ມ 10% heat-inactivated sterile fetal calf serum [FCS] (ເພື່ອເພີ່ມການເຕີບໂຕຂອງແມ່ກາຝາກ), 1% BME vitamins, 2% sterile human urine (ເຮັດໃຫ້ອະເຊື້ອດ້ວຍການກອງດ້ວຍ syringe filter Filtropur® S 0.2 µm), 250 µg/mL amikacin (ຫຼື 50 µg/mL gentamicin, ຫຼື ສ່ວນປະສົມ antibiotics ແລະ amino acids (L-glutamine 200 mM-penicillin 10 000 U-streptomycin 10 mg/mL) [47]. ຫຼັງ 3 ວັນ, ຖ້າບໍ່ມີການປົນເປື້ອນ, ແມ່ນໃຫ້ນຳເອົາມາຍາຍໃສ່ໃນພູມປຸກທີ່ແຊແຂງທີ່ກຽມຢູ່ເໝາະສົມ ແລະ ເກັບໄວ້ທີ່ -80°C ເປັນເວລາ 1-2 ປີ ຫຼື ໃນໄມໂຕຣເຈນແຫຼວ -196°C ເພື່ອການຮັກສາໃນໄລຍະຍາວ ແລະ ການໃຊ້ທົດລອງໃນອະນາຄົດ [7].

4.5. ຕ່ອມນ້ຳລາຍ (Salivary glands)

ການຜ່າຕັດ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ເປັນເຕັກນິກພື້ນຖານສຳລັບການສຶກສາຄວາມສຳພັນລະຫວ່າງ vector-pathogen, ໂດຍສະເພາະການກວດຫາໄວຣັດທີ່ມີແມງໄມ້ເປັນພາຫະ (arboviruses) ເຊັ່ນ Phlebovirus (ຕົວຢ່າງ Toscana virus) [44, 75]. ເນື່ອງຈາກຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍມີຂະໜາດນ້ອຍ, ຂັ້ນຕອນນີ້ຕ້ອງການຄວາມແມ່ນຍຳສູງພາຍໃຕ້ກ້ອງຜ່າຕັດສະເຕຣິໂອ, ໃຊ້ ຄີບທີ່ນ້ອຍລະອຽດ ຫຼື ເຂັມຜ່າຕັດນ້ອຍໆເພື່ອແຍກ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ທີ່ອ່ອນໄຫວບໍ່ເຮັດໃຫ້ແຕກ ຫຼື ປົນເປື້ອນ (<https://zenodo.org/records/18302850>) [51, 61].

ການຮັກສາຄວາມສົມບູນຂອງ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ເປັນສິ່ງສຳຄັນຕໍ່ການວິເຄາະໂມເລກູນຕໍ່ໄປ. ເມື່ອແຍກອອກມາໂດຍ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ສາມາດ ນຳມາບິດ ແລະ ກວດດ້ວຍ RT-PCR, qPCR, ຫຼື immunoassays ເພື່ອຊອກຫາ viral RNA ຫຼື antigens [12]. ການພົບ viruses ໃນ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ (ແທນທີ່ຈະເປັນ gut ຫຼື hemocoel) ຍືນຍັນວ່າ ເຊື້ອໂດຍຜ່ານໄລຍະການປົມເຊື້ອ extrinsic incubation period ແລະ ສາມາດຕິດຕໍ່ໂຕໃນລະຫວ່າງການກິນເລືອດຂອງພາຫະ [71].

ການຜ່າຕັດນີ້ຍາກເນື່ອງຈາກຂະໜາດນ້ອຍຂອງ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ຕ້ອງການຄວາມຊຳນານສູງເພື່ອຫຼີກເວັ້ນການເສື່ອມສະພາບຕົວຢ່າງ [1, 51]. ນອກຈາກນີ້, viral loads ອາດຕ່ຳ, ຕ້ອງໃຊ້ວິທີຊອກຫາທີ່ມີຄວາມອ່ອນໄຫວສູງເຊັ່ນ nested PCR ຫຼື high-throughput sequencing [54]. ຄວາມສ່ຽງປົນເປື້ອນ ເນັ້ນໃຫ້ ເຫັນເຖິງຄວາມຈຳເປັນຂອງ sterile techniques. ນອກເໜືອຈາກຄວາມຍາກດ້ານເຕັກນິກ, ປັດໄຈທາງຊີວະພາບ ຍັງສົ່ງຜົນກະທົບຕໍ່ຄວາມສຳເລັດ; ຄວາມສາມາດເປັນ vector ແຕກຕ່າງກັນລະຫວ່າງຊະນິດ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ແລະ ອັດຕາການຕິດເຊື້ອ ປຽນແປງຕາມເງື່ອນໄຂນິເວດ ແລະ ລະດູການ [33, 61].

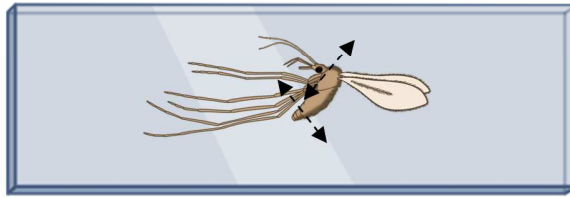
ການຊອກຫາ viruses ໃນ ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ໃຫ້ຂໍ້ມູນສຳຄັນກ່ຽວກັບຄວາມສ່ຽງການຕິດຕໍ່, ອະນຸຍາດໃຫ້ມີການຕິດຕາມ ແລະ ມາດຕະການຄວບຄຸມເປົ້າໝາຍ [15]. ຕົວຢ່າງ, ການພົບ Toscana virus ໃນ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ໃນເຂດ endemic ໂດຍຊ່ວຍປັບປຸງໂປຣໂຕຄອນການກວດ ແລະ ຄຳແນະນຳສາທາລະນະສຸກ [18]. ນອກຈາກນີ້, ການສຶກສາການຕິດຕໍ່ລະຫວ່າງ virus-ກຳລາຍ ອາດເປີດເຜີຍເປົ້າໝາຍໃໝ່ສຳລັບ vaccines ຫຼື therapeutics ທີ່ຂັດຂວາງການຕິດຕໍ່ [15, 18].

ຕ່ອມນ້ຳລາຍ ຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ຍັງສາມາດໃຊ້ເປັນແຫຼ່ງ antigens ສຳລັບການວັດແທກ antibodies ຂອງ host ຕໍ່ນ້ຳລາຍ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ດ້ວຍວິທີ immunological, ໂດຍສະເພາະ ELISA. ວິທີນີ້ອະນຸຍາດໃຫ້ປະເມີນການສຳຜັດຂອງ host ກັບການກັດຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ, ຊ່ວຍປະເມີນປະສິດທິພາບຂອງມາດຕະການຄວບຄຸມ vector [25] ແລະ ຄວາມສ່ຽງການຕິດຕໍ່ *Leishmania* [40].

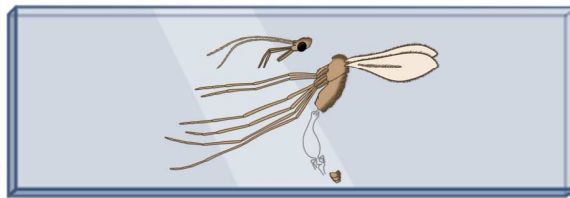
ຕົວຢ່າງຈາກກັບດັກ (CDC) - ທໍ່ດູດ (Aspirator)

ສະຫຼົບ (Killing)

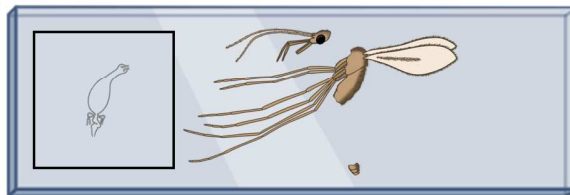
ຂັ້ນຕອນ 1
ຕັດໃນນໍ້າເກືອເຊໂຣມອະເຊື້ອ
NSS



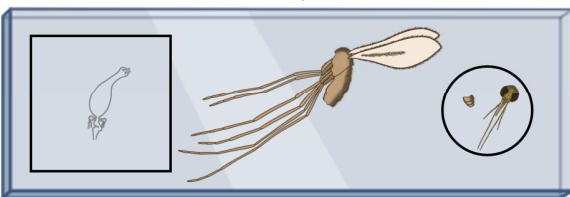
ຂັ້ນຕອນ 2
ດຶງແຍກລໍາໄສ້ ໃນນໍ້າເກືອ
ເຊໂຣມອະເຊື້ອ NSS



ຂັ້ນຕອນ 3
ວາງລໍາໄສ້ໃນນໍ້າເກືອຢອດໃໝ່
ປິດດ້ວຍແຜ່ນປົກສະໄລສີ່ຫຼ່ຽມ
ຂະໜາດ 22 x 22 ມມ ທີ່ອະ
ເຊື້ອແລ້ວ



ຂັ້ນຕອນ 4
ວາງຫົວຜ່ອມຈັດທໍາຂວ້ມ
ໜ້າ-ຫຼັງ ແລະ ວາງກິ້ນໃສ່ໃນ
ຢອດນໍ້າຢາ Marc-André ນຶ່ງ
ຢອດປິດດ້ວຍແຜ່ນປົກສະໄລມົນ
ຂະໜາດ 12 ມມ



ສອງກ້ອງເບິ່ງ *Leishmania*

ໃຊ້ຕົວຢ່າງທາງໂມເລກູນ

ຈໍາແນກຊະນິດ

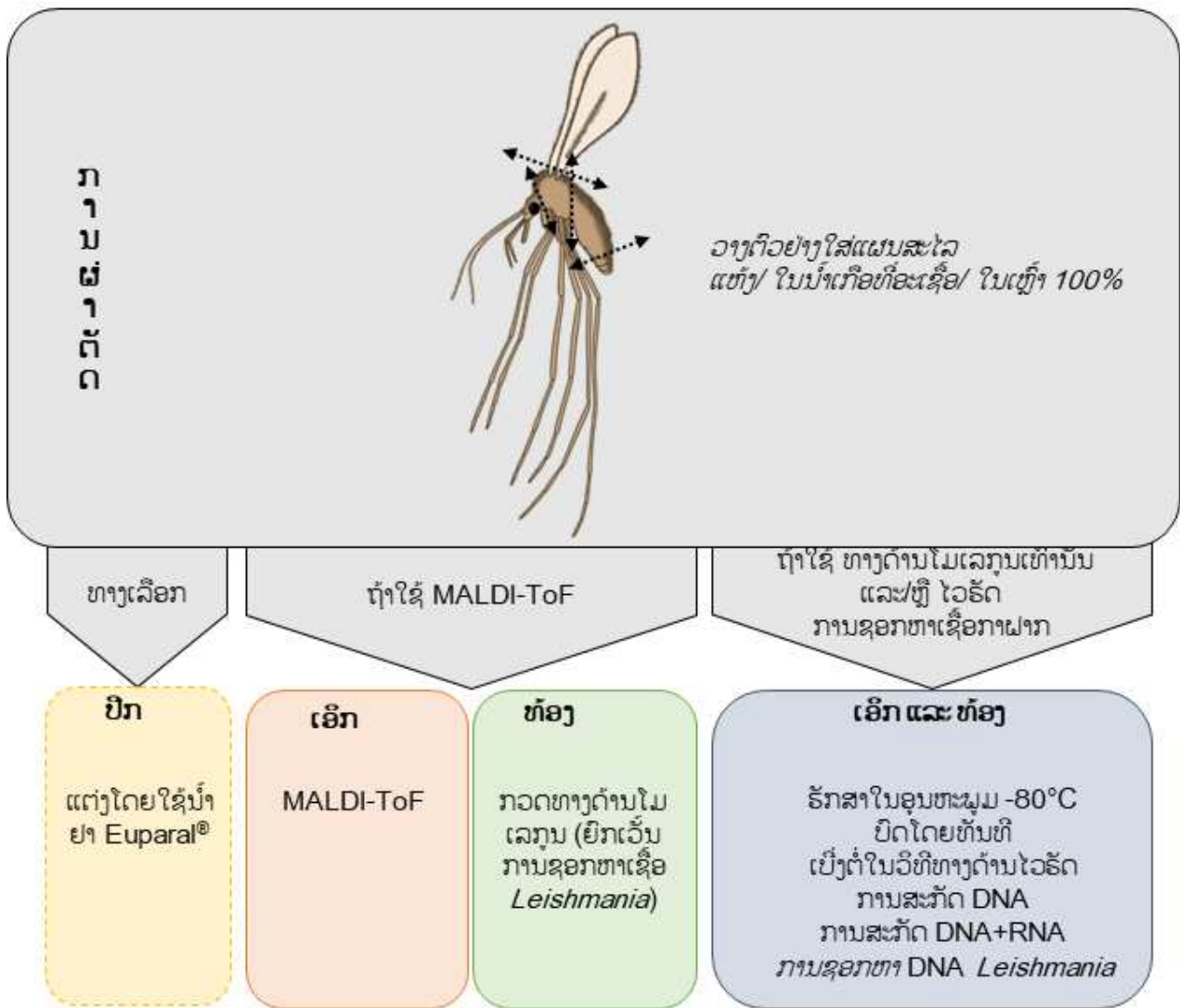
ແຕ່ງສະໄລຄືນ
ໂດຍໃຊ້ນໍ້າຢາ
ແຕ່ງສະໄລແບບບໍ່
ຖາວອນ

-

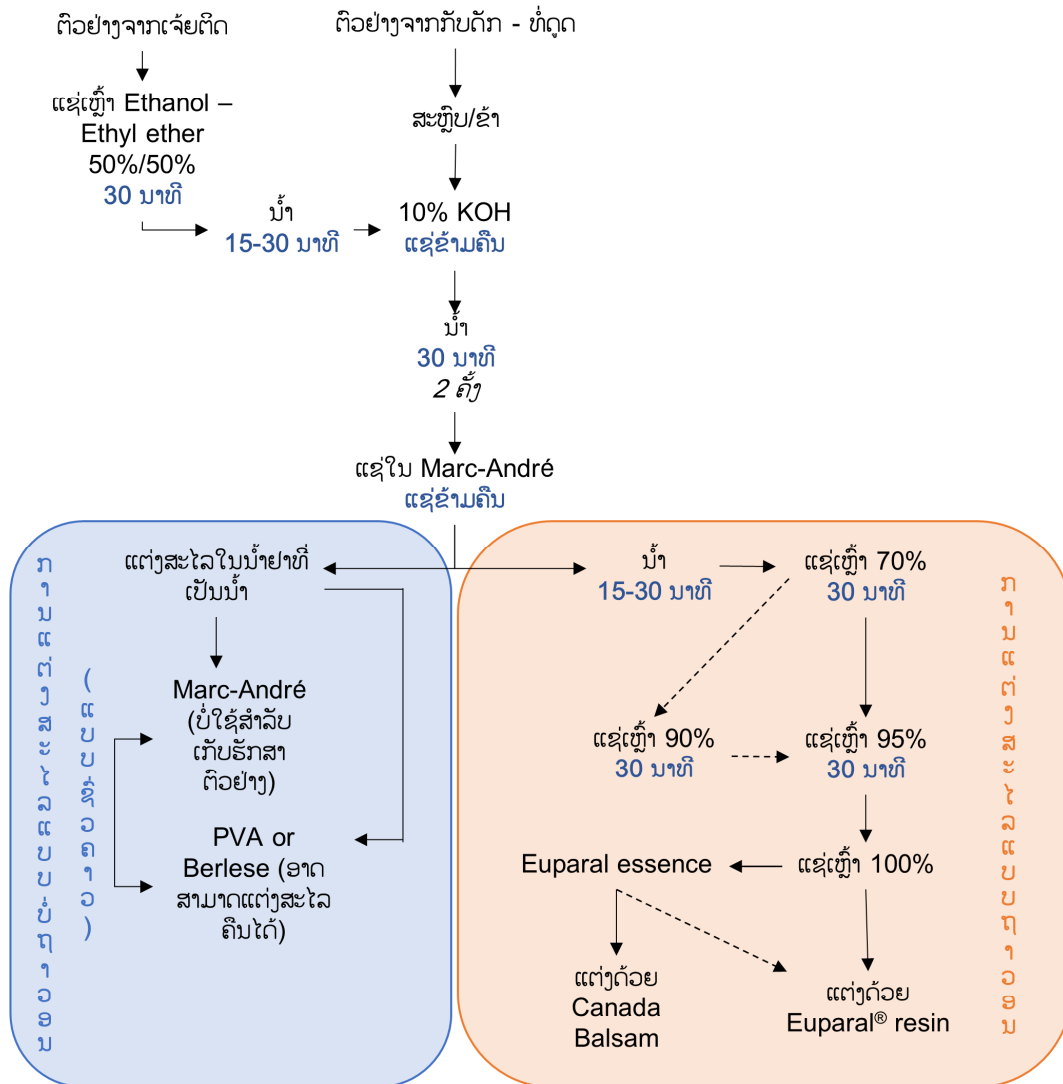
+

- 1) ເປີດແຜ່ນປົກ
- 2) ໃສ່ໃນຜຸມປູກ

ຮູບທີ 5: ວິທີການປູກແຍກເຊື້ອ *Leishmania*.



ຮູບທີ 6: ການກະກຽມຕົວຢ່າງຮັ່ນຝ່ອຍຊາຍ ສໍາລັບການນໍາໃຊ້ທາງຊີວະໂມເລກູນ, proteomics, ແລະ/ຫຼື virology applications.

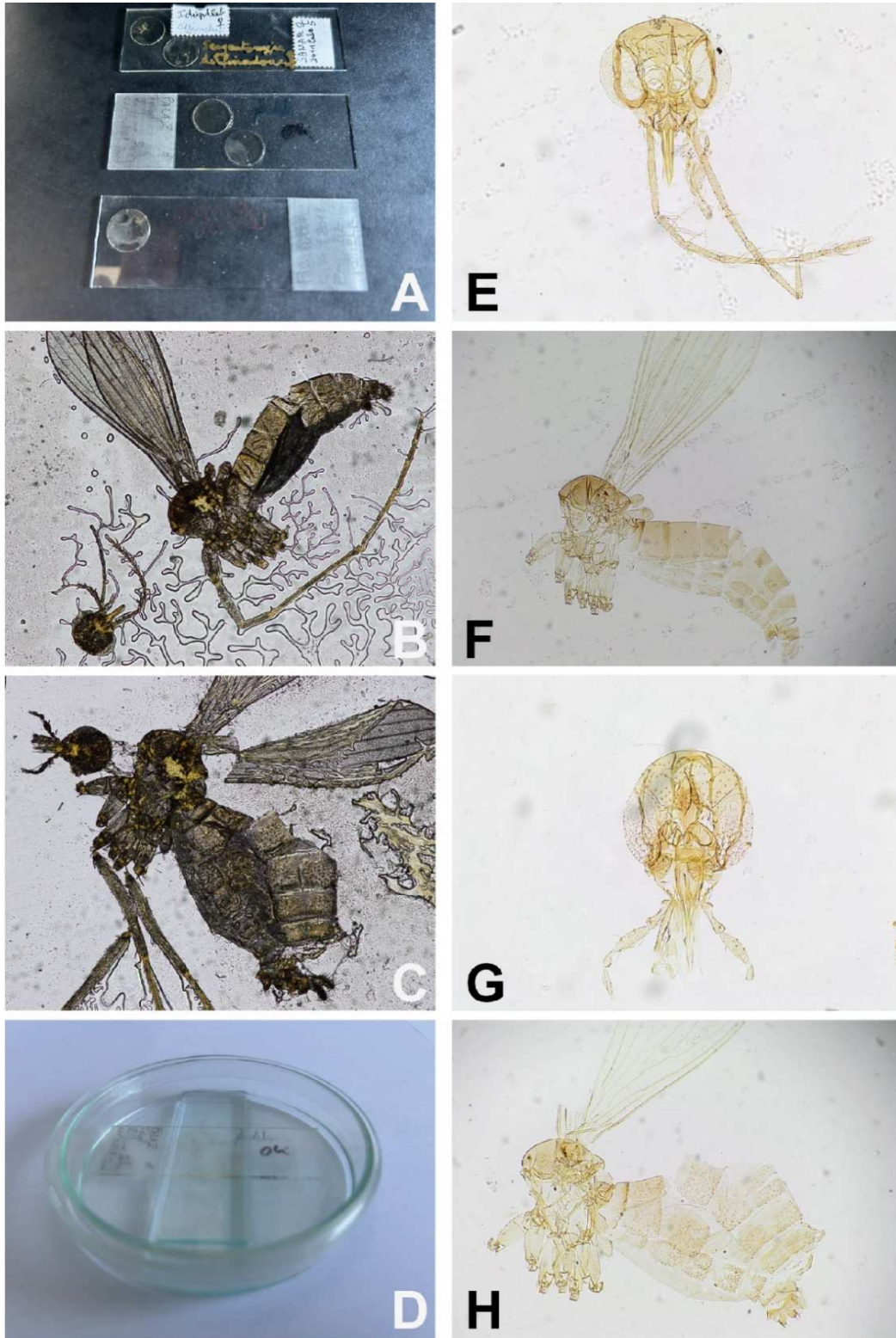


ຮູບທີ 7: ວິທີການພື້ນຖານ ສຳລັບຂັ້ນຕອນການກຽມຕົວຢ່າງຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ.

4.6. ການຈຳແນກຊະນິດອາຫານຈາກເລືອດ (Blood meal identification)

ຕົວແມ່ທີ່ມີເລືອດເຕັມ (engorged females) ທີ່ແຍກອອກຈາກການຈັບ ຄວນໄດ້ຮັບການຜ່າຕັດດ້ວຍອຸປະກອນໃຊ້ດັ່ງກ່າວເພື່ອປຸງອາຫານປົນເປື້ອນ. ທ້ອງຂອງຕົວຢ່າງຄວນໄດ້ຮັບການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງສະເຕຣີໂອເພື່ອປະເມີນຂັ້ນຕອນການຍ່ອຍເລືອດ. ແນະນຳ ໃຫ້ເລືອກພຽງຕົວແມ່ທີ່ມີທ້ອງສີແດງ, ນ້ຳຕານອ່ອນ, ຫຼືແດງເຂັ້ມ ໂດຍບໍ່ມີສັນ

ຍານການສ້າງໄຊ. ແຍກປາຍທ້ອງລວມ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ ອອກເພື່ອຈຳແນກຕົວແມ່ດ້ວຍ ຮູບຮ່າງ ຫຼັງການເຮັດໃຫ້ໃສແລ້ວ. ສ່ວນຫຼັກຂອງທ້ອງ (ບໍ່ລວມ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ) ຄວນໃສ່ໃນຫຼອດ



ຮູບ 8: ການແຕ່ງແຜ່ນແກຼວສະໄລໃໝ່, A: ແຜ່ນແກຼວສະໄລທີ່ເສຍຫາຍ ແລະ ແຫຼງ ທີ່ແຕ່ງດ້ວຍ Hoyer, B: ພາບກ້ອງຈຸລະທັດຂອງ ຮິ່ນຝອຍຊາຍທີ່ແຫຼງ, C: ພາບກ້ອງຈຸລະທັດຂອງ ຮິ່ນຝອຍຊາຍທີ່ເສຍຫາຍ, D: ຫ້ອງຊຸມທີ່ມີແຜ່ນແກຼວສະໄລທີ່ແຫຼງ, E: ຫົວ ແລະ F: ລໍາຕົວ ຂອງຕົວຢ່າງ B ຫຼັງຈາກແຕ່ງໃໝ່ໃນ Euparal®, G: ຫົວ ແລະ H: ລໍາຕົວ ຂອງຕົວຢ່າງ C ຫຼັງຈາກແຕ່ງໃໝ່ໃນ Euparal®.

Eppendorf® ແລະ ເກັບທີ່ອຸນຫະພູມ -20°C ຈົນກວ່າຈະວິເຄາະຕໍ່ໄປ. ຕົວຊີ້ບອກທາງກຳມະພັນທີ່ນຳໃຊ້ທົ່ວໄປສຳລັບການຈຳແນກຊະນິດອາຫານຈາກເລືອດ ເຊັ່ນ PNOc [5, 30, 50], CytB [67], ຫຼື COI [13] ໄດ້ຖືກສ້າງຕັ້ງແລະອະທິບາຍຢູ່ລະອຽດໃນເອກະສານອ້າງອີງ; ດັ່ງນັ້ນຈຶ່ງບໍ່ອະທິບາຍຊຳໃນເອກະສານນີ້ (ຮູບທີ 6). ອີກທາງເລືອກ, ເພື່ອຈຳແນກເລືອດຂອງ host, ການແມັບ peptide ດ້ວຍ MALDI-ToF ສາມາດນຳໃຊ້ [31]. ໄດ້ພິສູດທາງການທົດລອງວ່າວິທີນີ້ອະນຸຍາດໃຫ້ຈຳແນກເລືອດຂອງ host ໄດ້ໃນໄລຍະເວລາທີ່ຍາວກວ່າຫຼັງການກິນເລືອດ; ດັ່ງນັ້ນເປັນວິທີທີ່ເໝາະສົມ, ໂດຍສະເພາະສຳລັບການວິເຄາະຕົວແມ່ທີ່ມີເລືອດທີ່ຍ່ອຍໄປຫຼາຍຢູ່ເທິງໂຕຊັດເຈນ. ຕົວຢ່າງຄວນເກັບທີ່ -20°C ຫຼື 4°C

ແຕ່ຜົນດີອາດໄດ້ຈາກການເກັບໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງໄລຍະສັ້ນ. ທ້ອງຂອງຕົວແມ່ທີ່ມີເລືອດ ຄວນໄດ້ຮັບການຜ່າຕັດແຍກຈາກຮ່າງກາຍກ່ອນການວິເຄາະ ແລະ ບິດ ໃນນ້ຳກັນ. ສ່ວນທີ່ເຫຼືອຂອງຮ່າງກາຍຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ຍັງພ້ອມໃຊ້ສຳລັບການວິເຄາະໂມເລກູນ ແລະ ສຶກສາຮູບຮ່າງ ອື່ນໆ. ຫຼັງເອົາ aliquot ຈາກ homogenate ສຳລັບ MALDI-ToF peptide mapping, ສ່ວນທີ່ເຫຼືອສາມາດໃຊ້ສຳລັບການສະກັດ DNA ເພື່ອຢືນຢັນການຈຳແນກເລືອດຂອງ host ແລະ/ຫຼື ສະແກນການມີ Leishmania sp. ໂດຍລວມ, ໄລຍະເວລາກະກຽມ ແລະ ວິເຄາະຕົວຢ່າງ ສັ້ນຫຼາຍເມື່ອປຽບທຽບກັບເຕັກນິກໂມເລກູນເຊື້ອ DNA.

ຕາຕະລາງ 2: ສ່ວນປະກອບຂອງນ້ຳຢາທີ່ນຳໃຊ້.

<p>Potassium hydroxide 10% Potassium hydroxide 10 g ນ້ຳກັນຕົ້ມໃຫ້ໄດ້ 100 mL</p>	<p>Fuchsin acid 1% ໃນນ້ຳກັນ Acid fuchsin (as a powder) 1 g ນ້ຳກັນ 99 mL</p>
<p>Gum chloral mounting media (Hoyer medium) ນ້ຳກັນ 50 mL Hydrate de chloral 200 g</p>	<p>ສານລະລາຍ Marc-André ຍ້ອມສີດ້ວຍ acid fuchsin ສານລະລາຍ Marc-André 10mL Fuchsine à 1 % 50 µL</p>
<p>ສານລະລາຍ Marc-André Hydrate de chloral 40 g Acide acétique glacial 30 mL ນ້ຳກັນ 30 mL</p>	<p>Enecê medium Colophane blanche pure 22 g Gomme copale soluble dans l'alcool 12 g Éthanol absolu 20 mL Camphre 10 g Essence de térébenthine 10 mL Eucalyptol 26 mL</p>

5. ຂັ້ນຕອນການກະກຽມຕົວຢ່າງສຳລັບການສຶກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງ (ຮູບທີ 3, 6, 7 ແລະ 8; ເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 1, 2, 3 ແລະ 4)

ພາກສ່ວນນີ້ອະທິບາຍຫຼັກການກະກຽມຕົວຢ່າງ ຮື້ນຝ່ອຍຊາຍສຳລັບການແຕ່ງສະໄລເພື່ອການສຶກສາລັກສະນະຮູບຮ່າງເທົ່ານັ້ນ, ຕາມດ້ວຍການປັບໃຊ້ກັບການນຳໃຊ້ນອກເໜືອຈາກ ສຶກສາຮູບຮ່າງ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ, ການເຂົ້າໃຈ methodology ນີ້ ເປັນສິ່ງສຳຄັນເພາະອະນຸຍາດໃຫ້ປັບຂັ້ນຕອນໃຫ້ເໝາະກັບປະເພດຕົວຢ່າງພິເສດເມື່ອຈຳເປັນ.

ການປະຕິບັດກ່ຽວຂ້ອງກັບຂັ້ນຕອນເອົາອອກ ແລະ ເຕີມເຕັມຕິດຕໍ່ກັນໂດຍໃຊ້ Pasteur pipettes ທີ່ຕິດຢ່າງອ່ອນ.

ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ພາຊະນະແກ່ວກົມລູມ ເພາະຊ່ວຍງ່າຍຕໍ່ການດຳເນີນການເຫຼົ່ານີ້ຢ່າງຫຼາຍ. ແກ່ວບໍ່ປະຕິກິລິຍາກັບ reagents ທັງໝົດ. ເພື່ອປ້ອງກັນການລະເຫີຍ reagents, ພາຊະນະຄວນມີຝາ ແລະ ບໍ່ເຕັມເກີນໄປ ເພື່ອຫຼີກເວັ້ນການເລື່ອຍເມື່ອປິດ ຫຼື ເປີດ ແລະ ປ້ອງກັນການຕົກຂອງຝຸ່ນໃສ່ຕົວຢ່າງ. ສານເຄມີທີ່ຕ້ອງການສຳລັບການເຮັດໃຫ້ໃສ ແລະ ການປະມວນຜົນ ສະແດງໃນຕາຕະລາງ 2.

5.1. ການເຮັດໃຫ້ໃສ (Clearing)

ກ່ອນທີ່ຕົວຢ່າງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ຈະສາມາດກະກຽມເປັນການແຕ່ງສະໄລຖາວອນ (permanent slide mounts), ຕ້ອງເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສກ່ອນ ດ້ວຍການ maceration ໂດຍໃຊ້ວິທີ ແລະ ນ້ຳຢາເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສ ທີ່ເໝາະສົມ (ເຊັ່ນ: ນ້ຳຢາ acetic acid 10% ຫຼື ນ້ຳ Marc-André ທີ່ມີ chloral hydrate ເຊິ່ງເປັນສານເຄມີທີ່ຖືກຈຳກັດໃນຫຼາຍປະເທດ) ເພື່ອເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງໂປຼໄຊໃສ.

ຂັ້ນຕອນການເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສແມ່ນການກຳຈັດເນື້ອເຍື່ອ, ໄຂມັນ, ນ້ຳຂັບຍ່ອຍ, ແລະ ໄຂຂີ້ເຜີ້ງ ເພື່ອເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງໂປຼໄຊໃສ, ຊ່ວຍໃຫ້ສາມາດສັງເກດເບິ່ງໂຄງສ້າງ exoskeletal (ເຊັ່ນ: ຕໍາແໜ່ງການຕິດຂອງຂົນ setae), ລັກສະນະພື້ນຜິວ (ເຊັ່ນ: ການກະຈາຍສີ), ແລະ ລັກສະນະພາຍໃນ ທີ່ເຫັນໄດ້ຜ່ານ tegument (ເຊັ່ນ: ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ).

ຂັ້ນຕອນການເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສ 2 ຂັ້ນຕອນ ໂດຍການໃຊ້ ທາດດ່າງ (base) ແຂງ (ເຊັ່ນ potassium hydroxide) ກ່ອນ ຕາມດ້ວຍ ກົດອ່ອນ (ເຊັ່ນ acetic acid ໃນນ້ຳ Marc-André) ເຊິ່ງມີຈຸດປະສົງທາງເຄມີຊີວະທາດຕ່າງກັນ [74]. ທາດດ່າງທຳລາຍເນື້ອເຍື່ອອ່ອນ ເຊັ່ນ ໂປຣຕິນ, ໄຂມັນ, ແລະ ກ້າມເນື້ອ ຜ່ານ saponification ແລະ protein denaturation ໂດຍຮັກສາ exoskeleton chitin ໃຫ້ຄົງສະພາບເພື່ອຄວາມຊັດເຈນໂຄງສ້າງ. ກົດອ່ອນທີ່ຕາມມາເປັນການກຳຈັດ alkali ທີ່ເຫຼືອ ປູງກັນການເສື່ອມສະພາບຕໍ່ໄປ ແລະ ເຮັດໃຫ້ chitin ຂາວເພື່ອເພີ່ມຄວາມໂປຼໄຊໃສ [74] ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ ການລ້າງຕົວຢ່າງໃນ ນ້ຳກັນ 2 ຄັ້ງ ເປັນເວລາ 15 ນາທີ ກໍ່ສາມາດເປັນການກຳຈັດ ທາດດ່າງໄດ້ພຽງພໍ. ການປະຕິບັດຕາມລຳດັບນີ້ ປະສົມການກຳຈັດເນື້ອເຍື່ອທີ່ມີປະສິດທິພາບກັບການຮັກສາອ່ອນໆ ຮັບປະກັນຄວາມສົມບູນຂອງຕົວຢ່າງທີ່ດີທີ່ສຸດສຳລັບການສັງເກດດ້ວຍ ກ້ອງຈຸລະທັດ.

ແນະນຳໃຫ້ລ້າງໃນ ນ້ຳກັນ 2 ຄັ້ງ ເປັນເວລາ 20 ນາທີ ກ່ອນການດຳເນີນການຂັ້ນຕໍ່ໄປ.

5.1.1. ການຍ່ອຍສະຫຼາຍເນື້ອເຍື່ອອ່ອນ (Soft tissue lysis) (ຮູບທີ 8)

Sodium hydroxide (NaOH) ຫຼື potassium hydroxide (KOH) ເປັນນ້ຳຢາ macerating ທາງເຄມີທີ່ນຳໃຊ້ທົ່ວໄປ ໃຊ້ໃນຄວາມເຂັ້ມ ແລະ ໄລຍະເວລາຕ່າງກັນ ຂຶ້ນກັບຂະໜາດ ແລະ ຄວາມອ່ອນໄວຂອງຕົວຢ່າງ. ເຕັກນິກມາດຕະຖານ ແລະ ມີປະສິດທິພາບທີ່ສຸດ ກ່ຽວຂ້ອງກັບການແຕກເນື້ອເຍື່ອອ່ອນ ໂດຍແຊຮື້ນຝ່ອຍຊາຍ ໃນ ທາດດ່າງແຂງ (10% KOH ຫຼື NaOH) ຕະຫຼອດຄືນ. ສາມາດເພີ່ມຄວາມເຂັ້ມເພື່ອຫຼຸດໄລຍະເວລາ (ເຊັ່ນ: KOH 20% ເປັນເວລາ 6 ຊົ່ວໂມງ) ພ້ອມກັບການເຮັດຄວາມຮ້ອນ ທີ່ 37°C.

5.1.2. ການເຮັດໃຫ້ໃສ ພ້ອມດ້ວຍ ຫຼື ບໍ່ມີ ການຍ່ອມສີ

ຂັ້ນຕອນນີ້ຕາມດ້ວຍການເຮັດໃຫ້ແຈ້ງຂຶ້ນ ປົກກະຕິປະສົມ acetic acid ແລະ chloral hydrate (ເຊັ່ນ: ນ້ຳ Marc-André). ຫຼັງການເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສ ຕົວຢ່າງຕ້ອງລ້າງຢ່າງລະອຽດໃນນ້ຳ ຢ່າງໜ້ອຍ 2 ຄັ້ງຕິດຕໍ່ກັນ ເປັນເວລາ 20 ນາທີ ແຕ່ລະຄັ້ງເພື່ອກຳຈັດນ້ຳຢາທີ່ເຫຼືອ.

ນ້ຳຢາ Marc-André ເປັນນ້ຳຢາເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສທີ່ນຳໃຊ້ທົ່ວໄປສຳລັບການກະກຽມຕົວຢ່າງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ.

ປະສິດທິພາບຂອງມັນຢູ່ໃນການຊ່ວຍຂັ້ນຕອນການເຮັດໃຫ້ໂປຼໄຊໃສ ໃນຂະນະທີ່ຫຼຸດຜ່ອນການເສຍຫາຍຢ່າງຮຸນແຮງຕໍ່ໂຄງສ້າງອ່ອນໄວ ເຊັ່ນ ປົກ ແລະ ໜວດ.

ນ້ຳຢານີ້ຄວນກຽມໃໝ່ ຫຼື ເກັບໃນພາຊະນະບົດແໜ້ນເພື່ອປູກັນການລະເຫີຍ ຫຼື ການເສື່ອມສະພາບ. ການໃຊ້ນ້ຳ Marc-André ມີຂໍ້ດີເປັນພິເສດ ເມື່ອປະສົມກັບເຕັກນິກການເຮັດໃຫ້ແຈ້ງຂຶ້ນ ຫຼື ການຍ່ອມສີ ເພື່ອເພີ່ມລາຍລະອຽດທາງດ້ານຮູບຮ່າງພິເສດ. ລາຍລະອຽດອົງປະກອບ ແລະ ການກຽມ ສະແດງໃນເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 2.

ສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ໂປຼໄຊໃສຫຼາຍ, ການຍ່ອມສີອາດຈຳເປັນເພື່ອເພີ່ມຄວາມສາມາດເບິ່ງເຫັນກ່ອນການແຕ່ງ ສະໄລ. ມີນ້ຳຍ່ອມສີຫຼາຍຊະນິດ ແຕ່ລະອັນມີເປົ້າໝາຍສະເພາະຕາມອົງປະກອບເຄມີພິເສດຂອງສິ່ງມີຊີວິດ ນັ້ນໆ ສຳຄັນຕ້ອງເລືອກນ້ຳທາສີທີ່ເຂົ້າກັນໄດ້ກັບຕົວຢ່າງ ແລະ ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ເລືອກ. ວິທີການພື້ນຖານນີ້ສາມາດປັບໃຊ້ໄດ້ ເຊັ່ນ: ເພີ່ມ acid fuchsin 0.1% ໃນນ້ຳ Marc-André ເພື່ອການທາສີ. ນອກຈາກນີ້, ຕົວຢ່າງທີ່ເກັບໃນນ້ຳ ແລະ ຕ້ອງການແຕ່ງສະໄລໃນ resin ຕ້ອງການ dehydration (ເບິ່ງບົດ 5.2 ກ່ຽວກັບ Dehydration) ເພາະນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ resin ທຳມະຊາດ ແລະ ສັງລະສິດສ່ວນໃຫຍ່ບໍ່ເຂົ້າກັນກັບນ້ຳ. New (1974) ບັນທຶກວ່ານ້ຳທາສີບາງອັນເສື່ອມສະພາບໃນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລບາງຊະນິດ [53]. ຕົວຢ່າງ acid fuchsin ທີ່ນຳໃຊ້ກັບ Canada balsam ຍັງສາມາດຄົງສະພາບໃນ Euparal®. ເຖິງຢ່າງໃດກໍຕາມ ຕົວຢ່າງທີ່ທາດ້ວຍ acid fuchsin ອາດຈາງງາຍ ໂດຍສະເພາະເມື່ອມີ clove oil ເປັນນ້ຳຢາ cleared ສຸດທ້າຍເຫຼືອຢູ່. ຕົວຢ່າງທີ່ເກັບໃນ clove oil ອາດຈາງຢ່າງຫຼາຍໃນສອງສາມວັນ.

5.2. ການເອົານ້ຳອອກ (Dehydration)

ການເອົານ້ຳອອກ ດຳເນີນໂດຍການຖ່າຍຕົວຢ່າງຜ່ານລຳດັບນ້ຳຢາ ethanol ທີ່ເພີ່ມຄວາມເຂັ້ມທາງລະດັບ: 50%, 70%, 80%, 90%, ຫຼື 95% ແລະ ສຸດທ້າຍ 100% ແຕ່ລະອ່າງຢ່າງໜ້ອຍ 20 ນາທີ. ເນື່ອງຈາກ ethanol ລະເຫີຍໄວ

ພາຊະນະຕ້ອງປົດແໜ້ນໃນລະຫວ່າງການປະມວນຜົນ. ເມື່ອຕົວຢ່າງແຫຼງສົມບູນແລ້ວ ສາມາດຢຸດການປະມວນຜົນເປັນເວລາສອງສາມວັນໃນ Euparal® essence ເຊິ່ງດີກວ່າ clove oil. Beech creosote ເຄີຍນຳໃຊ້ກວ່າໆໃນຈຸດນີ້ ແຕ່ປັດຈຸບັນຖືກຫ້າມຢ່າງສົມບູນເນື່ອງຈາກຄວາມເປັນພິດ.

ຂັ້ນຕອນການເອົານ້ຳອອກ ຕ້ອງຮັບປະກັນວ່ານ້ຳໃນຕົວຢ່າງເຂົ້າກັນໄດ້ກັບນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ເພື່ອປູກັນ opacity, osmotic collapse, ຫຼື distortion ທີ່ອາດເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງບໍ່ເໝາະສຳລັບການສຶກສາ ການຈຳແນກຊະນິດ.

5.3. ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ (Mounting media)

5.3.1. ການເລືອກ ແລະ ການນຳໃຊ້ສຳລັບການກະກຽມຕົວຢ່າງ

ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ຄວນມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງ (refractive index) ໃກ້ຄຽງກັບແກຼວທີ່ສຸດ ຄືປະມານ 1.5. ຕ້ອງບໍ່ມີສີ, ໂປຼຽໃສ, ແລະ ຄິງຄວາມໂປຼຽໃສຢ່າງສົມບູນ ຫຼັງການແຕ່ງ ແລະ ຕາມເວລາ. ຕ້ອງເຂົ້າກັນໄດ້ກັບນ້ຳທາສີທີ່ນຳໃຊ້ ແລະ ສາມາດເຂົ້າໄປ ແລະ ກະຈາຍໃນເນື້ອເຍື່ອທັງໝົດຂອງຕົວຢ່າງ. ຕ້ອງບໍ່ແຕ່ງໄວເກີນໄປ ຫຼື ສ້າງຄວາມມົວໃນລະຫວ່າງການແຕ່ງສະໄລ.

ຕ້ອງບໍ່ຫຍໍ້ຕົວຫຼັງການແຕ່ງສະໄລ. ການເລືອກນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ເໝາະສົມ ເປັນສິ່ງພື້ນຖານຂອງການກະກຽມຕົວຢ່າງ ເພາະບໍ່ມີນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລອັນໃດເໝາະສົມກັບທຸກຈຸດປະສົງ. ການເລືອກຄວນສົມດຸນກັບປັດໄຈສຳຄັນຫຼາຍຢ່າງ:

- **ຄຸນສົມບັດດ້ານການເບິ່ງເຫັນ (Optical properties).** ດັດສະນີສະທ້ອນແສງຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ຄວນໃຫ້ contrast ແລະ ການສະທ້ອນແສງພຽງພໍ

ຕໍ່ລັກສະນະກາຍວິທະຍາສຳຄັນທີ່ໃຊ້ໃນການຈຳແນກຊະນິດ ຫຼື ການອະທິບາຍ ຮູບຮ່າງ ເຊັ່ນ ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ, ascoids, Newstead sensilla, vertical cibarial teeth, ແລະ pharyngeal teeth. ການເບິ່ງເຫັນຂອງໂຄງສ້າງເຫຼົ່ານີ້ ຂຶ້ນກັບຄຸນສົມບັດດ້ານການເບິ່ງເຫັນຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລໂດຍກົງ.

- **ການຮັກສາ (Preservation).** ສຳລັບຕົວຢ່າງປະເພດ (type specimens) ຫຼື ວັດສະດຸທີ່ຕ້ອງການເກັບຮັກສາໄວ້ຖາວອນ, ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລຕ້ອງໃຫ້ຄວາມສະຖຽນທີ່ຍາວນານ ແລະ ຄວາມທົນທານ. ໃນທາງກົງກັນຂ້າມ ສຳລັບການສຶກສາສິນຄ້າຄົ້ນຄວ້າ ຫຼື ການສຳຫຼວດດ້ານການແພ່ກະຈາຍພະຍາດ ທີ່ການຮັກສາໄລຍະຍາວບໍ່ສຳຄັນ ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລຊົ່ວຄາວ ຫຼື ກາງກອຍ ອາດພຽງພໍ.

5.3.2. ຄວາມຕ້ອງການສຳລັບນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ

ນັກຊ່ຽວຊານມັກພັດທະນາເຕັກນິກການແຕ່ງສະໄລທີ່ປັບແຕ່ງ ແລະ ຊັບຊ້ອນ ຕາມຄວາມຕ້ອງການຂອງການຄົ້ນຄວ້າພິເສດ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ ວິທີເຫຼົ່ານີ້ມັກບໍ່ໄດ້ພິຈາລະນາເລື່ອງຄຸນນະພາບການເກັບຮັກສາໄລຍະຍາວ, ການເຂົ້າກັນໄດ້, ການມາດຕະຖານ, ຄວາມງ່າຍໃນການຈັດການ ແລະ ການຮັກສາໄລຍະຍາວ. ການຂາດມາດຕະຖານນີ້ ເຮັດໃຫ້ການປະສານງານຊຸດສະສົມທີ່ໄດ້ຮັບການບໍລິຈາກ ແລະ ການຮັກສາຊຸດສະສົມໄລຍະຍາວ ຍາກຂຶ້ນ.

ການນຳໃຊ້ທາງວິທະຍາສາດ ມີຄວາມຕ້ອງການທີ່ແຕກຕ່າງກັນ. ນັກ ອານຸກົມວິຖານມັກແຕ່ງສະໄລຕົວຢ່າງທັງໝົດ ແລະ ມັກນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ເຮັດໃຫ້ເນື້ອອະໄວຍະວະພາຍໃນແຕກອ່ອນໆ ເພື່ອເພີ່ມຄວາມເບິ່ງເຫັນຂອງໂຄງສ້າງ cuticular.

ດັດສະນີສະທ້ອນແສງຄວນຕ່າງກັນເທົ່າທີ່ຈະເປັນໄປໄດ້ກັບຕົວຢ່າງ ແລະ ແຜ່ນແກຼວ ເພື່ອເພີ່ມຄວາມໂປຼຽໃສດ້ານການເບິ່ງເຫັນ. ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລການຄ້າ

ປົກກະຕິຖືກອອກແບບໃຫ້ມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງໃກ້ກັບແກຼວ ເພື່ອຫຼຸດການສະທ້ອນແລະການກະຈາຍແສງຜ່ານລະບົບແຜ່ນແກຼວ– ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ–ແຜ່ນປົກ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ ໃນການສັງເກດດ້ວຍ brightfield microscopy ຄວາມຕ່າງທຳມະຊາດຂອງຕົວຢ່າງທີ່ບໍ່ທາສີ ສາມາດປັບແຕ່ງໄດ້ ໂດຍການເລືອກນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງຕ່າງກັນເລັກ ນ້ອຍກັບຕົວຢ່າງ ເພື່ອເພີ່ມຄວາມເບິ່ງເຫັນກັບພື້ນຫຼັງ.

5.3.3. ປະເພດຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ (ຕາຕະລາງ 3 ແລະ 4)

ການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ ຕ້ອງການດັດສະນີສະທ້ອນແສງ (RI) ຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ເພື່ອກຳນົດວ່າແສງແບນແນວໃດຜ່ານແຜ່ນແກຼວ, ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ແລະ ຕົວຢ່າງ. ເມື່ອ RI ໃກ້ກັບແກຼວແຜ່ນປົກ (≈ 1.515) ແສງຜ່ານໄດ້ເປັນເອກະພາບ

ຫຼຸດການກະຈາຍແລະການບິດເບືອນດ້ານການເບິ່ງເຫັນ ເຮັດໃຫ້ຄວາມລະອຽດ ແລະ ການເບິ່ງເຫັນໂຄງສ້າງລະອຽດດີຂຶ້ນ. ກົງກັນຂ້າມ ການບໍ່ກົງກັນຂອງ RI ອາດເຮັດໃຫ້ມີ halo, ຫຼື ບັງລັກສະນະທີ່ບໍ່ທາສີ. ການເລືອກນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ຖືກຕ້ອງ ສຳຄັນຕໍ່ການເພີ່ມ contrast, ຄວາມໂປຼຽໃສ ແລະ ຄຸນນະພາບຮູບພາບໂດຍລວມ ເນື່ອງຈາກ RI ທີ່ແຕກຕ່າງກັນລະຫວ່າງນ້ຳຢາຕ່າງໆ.

ດັດສະນີສະທ້ອນແສງຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ມີຜົນກະທົບຢ່າງຫຼວງຫຼາຍຕໍ່ການເບິ່ງເຫັນໂຄງສ້າງລະອຽດ ເມື່ອກະກຽມ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ສຳລັບການແຕ່ງສະໄລ. ລັກສະນະອ່ອນໄວ ແລະ ມີ sclerotized ນ້ອຍຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ເຊັ່ນ cibarial armature, ຖົງເກັບນ້ຳເຊື້ອ, ສ່ວນຂອງໜວດ, ແລະ ເສັ້ນເລືອດປົກ ອາດຍາກສັງເກດໃນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ມີ RI ສູງ.

ສຳລັບ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ທາງເລືອກທີ່ນຳໃຊ້ທົ່ວໄປປະກອບມີ gum-chloral media ເປັນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລອີງນ້ຳ ແລະ Canada balsam ກັບ Enecê - Nelson Cerqueira (NC) resin ເປັນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລອີງ solvent. Rawlins [60] ແບູນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລອອກເປັນ 2 ປະເພດ: (1) ນ້ຳຢາຖາວອນ (permanent media): ເຫຼົ່ານີ້ແຂງຕາມເວລາ ແລະ ເໝາະສຳລັບການຮັກສາໄລຍະຍາວ, ແລະ (2) ນ້ຳຢາກາງກອຍ (semi-permanent media): ບໍ່ແຂງ ແລະ ນຳໃຊ້ສຳລັບຈຸດປະສົງຊົ່ວຄາວ.

ຕາຕະລາງ 3: ອົງປະກອບຂອງນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ເລືອກມານໍາໃຊ້.

ສານນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລ	ສານເຮັດລະລາຍ (Solvent)	Pré-polymère(s) ou polymère(s) potentiel(s)	ໝາຍເຫດ
Hoyer = chloral gum	glycérol, ນໍ້າ	ສານປະກອບຂອງຢາງອາຣາບິກ (gum Arabic)	ຕົວເຮັດໃຫ້ຊຸ້ມ: ຄວໍຣໍໄຮເດຣດ
CMCP-9 (= carboxy methyl cellulose phenol)	ນໍ້າ (CMCP-9: 51–60%)	fully hydrolyzed polyvinyl alcohol (CMCP-9: 0–5%)	CMC(P)-9: ຄວາມໜຶດຕໍ່າ: ຄວາມໜຶດສູງ
DMHF (dimethyl hydantoin formaldehyde)	ນໍ້າ	N,N'-dimethylol dimethyl hydantoin (di-methylol DMH) Ether-/methylene-bridged oligomers Crosslinked DMH-formaldehyde polymer network	
Canada balsam	xylène; ສ່ວນປະກອບທີ່ລະເຫຼີຍໄດ້ບາງສ່ວນ ຂອງ balsam (Δ^3 -carène, acide lévopimarique, limonène, myrcène, acide palustrique, β -phéllandrène, α -pinène, β -pinène)	balsam (abienol, abietic acid, isopimaric acid, sandaracopimaric acid)	ການເຮັດໃຫ້ເປັນກາງ:: potassium carbonate; resin from <i>Abies balsamea</i> (Linné, 1758)
Euparal®	eucalyptol, paraldehyde; partly volatile components of gum sandarac (limonene, α -pinene, β -pinene)	ສານປະກອບຂອງ gum sandarac (communic acid, manool, polycommunic acid, sandaracopimaric acid, 12-acetoxy-sandaracopimaric acid, sugiol, torulosic acid, torulosol, totarol)	ສານເຮັດໃຫ້ໃສ: methyl salicylate; color in Euparal® green: copper salt (copper abietinate); sandarac resin from <i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl, 1791)
Enecê	ethyl alcohol; with camphor, eucalyptol and turpentine essence	Compounds of copal gum and colophony (rosin)	

ຊື່ (name)	ຂໍ້ດີ (Advantages)	ຂໍ້ເສຍ (Disadvantages)	ຫຼັກ
* Canada balsam	ນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລນີ້ມີຄວາມທົນທານສູງຫຼາຍ ດ້ວຍອາຍຸການໃຊ້ງານເກີນ 150 ປີ. ແຜ່ນແກ້ວສາມາດແຕ່ງສະໄລໄດ້ໂດຍໃຊ້ນໍ້າມັນ clove oil ຫຼື phenol ຕັ້ງແຕ່ແຕ່ງສະໄລ.	ມີອົງປະກອບທີ່ເປັນອັນຕະລາຍ ແລະ ຕ້ອງຈັດການພາຍໃຕ້ຕູ້ດູດຄວັນ (fume hood). ຕ້ອງການການເອົານໍ້າອອກ (dehydration) ຢ່າງຄົບຖ້ວນ ແລະ ໃຊ້ເວລາຫຼາຍ. ການເອົານໍ້າອອກດ້ວຍ ethanol ແລະ ການຖ່າຍຜ່ານ xylene ຫຼື clove oil ອາດເຮັດໃຫ້ບາງ taxa ກາຍເປັນອ່ອນໄວ ແລະ ແຕກຫຼາຍ; ທາງເລືອກອື່ນ (ເຊັ່ນ isopropanol, n-butanol, Cellosolve™, 1,4-dioxane, HistoClear, terpineol) ອາດຊ່ວຍຫຼຸດການແຕກ. ຕົວຢ່າງອາດປ່ຽນສີດຳ ຖ້າໃຊ້ phenol ແທນ xylene ຫຼື ຍັງມີ potassium hydroxide ເຫຼືອຢູ່. ດັດສະນີສະທ້ອນແສງສູງ ອາດເຮັດໃຫ້ໂຄງສ້າງທີ່ບໍ່ທາສີ ບໍ່ເຫັນຊັດເຈນ. ການແຕ່ງສີມບູນ ອາດໃຊ້ເວລາຫຼາຍປີ ຖ້າບໍ່ໃຊ້ hot-plate ໃນການແຕ່ງ. ນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລນີ້ ປ່ຽນສີເຫຼືອງ ແລະ ເຂັ້ມຂຶ້ນຕາມເວລາ ໂດຍສະເພາະເມື່ອເຮັດໃຫ້ໂປ່ງໃສດ້ວຍ clove oil.	
DMHF (dimethyl hydantoin formaldehyde)	ຄວາມໂປ່ງໃສສູງ ດັດສະນີສະທ້ອນແສງດີ ການເບິ່ງເຫັນໂຄງສ້າງເຢັນຢໍ່ ຄວາມສະຖຽນຂອງການກະກຽມດີໃນລະດັບພໍໃຊ້ ເຂົ້າກັນໄດ້ກັບເຕັກນິກການທາສີຫຼາຍຢ່າງ ການປົກປ້ອງຕົວຢ່າງດີ ການຕິດແຜ່ນແກ້ວກັບແຜ່ນປົກດີ	ນໍ້າທາສີບາງອັນ ອາດອ່ອນແລ້ງ ແລະ ນໍ້າທາສີ cationic ອາດຈາງ ຖ້ານໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລກາຍເປັນ acidic — ເຊິ່ງອາດເກີດຂຶ້ນໂດຍຕົນເອງຕາມເວລາ. ອາດປ່ຽນສີເຫຼືອງຕາມເວລາ ອາດປ່ຽນແປງນໍ້າຢາຍ້ອມສີບາງອັນ ບໍ່ເໝາະສໍາລັບນໍ້າຢາຍ້ອມສີທີ່ອ່ອນໄຫວຕໍ່ formaldehyde ມີຟອງອາກາດ, ແຫ້ງຊໍາ ນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລອ່ອນໄຫວຕໍ່ຄວາມຊຸ່ມ ການແຕ່ງສະໄລຍາກທີ່ຈະກັບຄືນ Formaldehyde ຕັ້ງແຕ່, ແຜ່, ກໍ່ໃຫ້ເກີດເຮັດມະເຮັງ	
* Euparal (transparent)	ນໍ້າຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ທົນທານ ດ້ວຍອາຍຸການໃຊ້ງານເກີນ 50 ປີ. ສາມາດແຕ່ງສະໄລໂດຍກົງຈາກ ethanol 80% ໄດ້ (ຕາມຄໍາແນະນໍາຂອງຜູ້ຜະລິດ). ບໍ່ບັງລັກສະນະທີ່ບໍ່ທາສີ ແລະ ບໍ່ປ່ຽນສີເຫຼືອງ ຫຼື ກາຍເປັນອ່ອນໄວຕາມເວລາ. ມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງ ເໝາະສົມກວ່າ Canada balsam ສໍາລັບ Diptera. ເຮັດວຽກດີກັບຕົວຢ່າງທີ່ໜາກວ່າ ເນື່ອງຈາກການຫຍໍ້ຕົວນ້ອຍ ແລະ ແຫ້ງໂດຍບໍ່ມີຟອງ. ຄໍາແນະນໍາ: ethanol 95%	ມີອົງປະກອບທີ່ເປັນອັນຕະລາຍ ແລະ ຕ້ອງຈັດການພາຍໃຕ້ຕູ້ດູດຄວັນ (fume hood). ການເອົານໍ້າອອກດ້ວຍ ethanol ແລະ ການຖ່າຍຜ່ານ Euparal Essence ອາດເຮັດໃຫ້ບາງ taxa ກາຍເປັນອ່ອນໄວ ແລະ ແຕກຫຼາຍ, ແຕ່ການໃຊ້ isopropanol ອາດຊ່ວຍຫຼຸດປັນຫານີ້ໄດ້.	

ຕາຕະລາງ 4 (ຕໍ່)

ຊື່ (name)	ຂໍ້ດີ (Advantages)	ຂໍ້ເສຍ (Disadvantages)
Hoyer fluid	ຕົວຢ່າງສາມາດແຕ່ງສະໄລໂດຍກົງຂະນະທີ່ຍັງມີຊີວິດ ຫຼື ຈາກນ້ຳ, ເອທານອນ, ຫຼື formaldehyde ໂດຍກົງ. ການ maceration ໃຫ້ຄຸນນະພາບ cuticle ທີ່ດີເລີດ. ມີດັດສະນີສະທ້ອນແສງທີ່ເໝາະສົມ ແລະ ສາມາດເພີ່ມ contrast ດ້ວຍການທາສີ iodine. Acetic acid ໃນສູດ ອາດເຮັດໃຫ້ອະໄວຍະວະຂອງ arthropod ຂະຫຍາຍ. ບາງຕົວຢ່າງອາດຄົງສະພາບໄດ້ 40–60 ປີ. ລະລາຍໃນນ້ຳ ອະນຸຍາດໃຫ້ການແຕ່ງສະໄລໃໝ່ງ່າຍ.	ຕົວຢ່າງພືດອ່ອນໄວ ອາດລົ້ມລົງ ຖ້າບໍ່ເພີ່ມນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລຊ້າໆ ເຊິ່ງໃຊ້ເວລາຫຼາຍ. ອາດເກີດຊ່ອງວ່າງ ແລະ ເຄສຕອນໄດ້ໃນເວລາໜ້ອຍກວ່າ 10 ປີ. ການ maceration ອາດເກີດຫຼາຍເກີນໄປ ຂຶ້ນກັບຄວາມເຂັ້ມຂອງ chloral hydrate ແລະ ໄລຍະເວລາສຳຜັດ. ອົງປະກອບຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ອາດແຍກອອກຈາກກັນ ແລະ ເກີດເມັດລະອຽດ (fine granulation) ໄດ້ໃນພາຍໃນເດືອນ ຫຼື ປີ. ມີການລາຍງານວ່ານ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ປ່ຽນສີດຳ.
CMCP-9 (= carboxy methyl cellulose phenol)	ຕົວຢ່າງສາມາດແຕ່ງສະໄລໂດຍກົງຈາກນ້ຳຢາຕ່າງໆ ເຊັ່ນ ນ້ຳ, ເອທານອນ, glycerol, ຫຼື ນ້ຳຢາທີ່ມີ formaldehyde, ແລະ ອະໄວຍະວະພາຍໃນ ອາດໄດ້ຮັບການ macerated ເມື່ອຈຳເປັນ ເພື່ອຊ່ວຍໃນການສຳຫຼວດທົ່ວໄປ ຫຼື ການກະກຽມ.	ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລນີ້ ອາດເກີດເຄສຕອນ ແລະ ປ່ຽນສີເຂັ້ມຂຶ້ນຕາມເວລາ ແລະ ບາງຄັ້ງອາດເຮັດໃຫ້ macerate ຕົວຢ່າງຫຼາຍກວ່າທີ່ຕ້ອງການ. ຖ້າບໍ່ໄດ້ເຮັດການປະທັບ (ringed) ແຜ່ນແກ້ວຢ່າງລະມັດລະວັງ ຕົວຢ່າງທີ່ຫນາກວ່າ ຈະບໍ່ເໝາະສົມ ເພາະອາດຫຍໍ້ຕົວ ແລະ ເກີດຊ່ອງວ່າງຮອບແຜ່ນປົກ. ບໍ່ເໝາະສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ທາສີ ຫຼື ອັດສະດຸທີ່ມີການຄິດ (calcified materials) ແລະ ໄລຍະເວລາແຫ້ງຊ້າກວ່າ CMC.
Eukitt™	ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ທົນທານ ດ້ວຍອາຍຸການໃຊ້ງານເກີນ 30 ປີ. ເຂົ້າກັນໄດ້ກັບ solvent ຫຼາຍຊະນິດສຳລັບການແຕ່ງສະໄລ ລວມທັງ acetone, benzene, chloroform, dioxan, ether, isopropanol, methyl benzoate, terpineol, toluene, ແລະ xylene. ແຫ້ງໄວ ແລະ ມີ pH ອາດເປັນກົດເລັກໜ້ອຍ. ບໍ່ປ່ຽນສີເຂັ້ມຢ່າງເຫັນໄດ້ຊັດເຈນ ຕາມອາຍຸ. ເໝາະສຳລັບນ້ຳທາສີຕ່າງໆ (ເຊັ່ນ fuchsin, hematoxylin, methyl green, methyl violet, methylene blue). ຕົວຢ່າງສາມາດແຕ່ງສະໄລໃໝ່ໄດ້ຫຼັງຜ່ານໄປຫຼາຍປີ ໂດຍການແຊໃນ xylene ເປັນເວລາດົນ.	ມີອົງປະກອບທີ່ເປັນອັນຕະລາຍ ແລະ ຕ້ອງຈັດການພາຍໃຕ້ຕູ້ດູດຄວັນ (fume hood). ຕ້ອງການການເອົານ້ຳອອກ (dehydration) ຢ່າງຄົບຖ້ວນ ແລະ ໃຊ້ເວລາຫຼາຍ. ບໍ່ເໝາະສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ຫນາກວ່າ ເນື່ອງຈາກການຫຍໍ້ຕົວ ແລະ ການເກີດຝອງແກ້ສ. ແຜ່ນປົກອາດລົ້ວອອກຕາມເວລາ ຖ້າບໍ່ເຮັດຄວາມສະອາດແກ້ວໃຫ້ດີ ແລະ ປະທັບໃຫ້ແໜ້ນ. ອາດສະແດງການ polymerize ບໍ່ສົມບູນ ຮອບເສັ້ນໄຍ collagen.
Enecê	ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ທົນທານສູງ ດ້ວຍອາຍຸການໃຊ້ງານຢ່າງໜ້ອຍ 50 ປີ. Enecê ບໍ່ປ່ຽນສີເຂັ້ມຂຶ້ນຕາມເວລາ. ມີຄວາມອ່ອນໄຫວຫຼາຍກວ່າ ອະນຸຍາດໃຫ້ດຳເນີນການຜ່າຕັດແມງໃນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ແລະ ໃຫ້ເວລາພຽງພໍສຳລັບການຈັດຕຳແໜ່ງໂຄງສ້າງ ຮູບຮ່າງ. ລາຄາຕໍ່ຕຳ.	ຕ້ອງການການເອົານ້ຳອອກ (dehydration) ຢ່າງຄົບຖ້ວນ ແລະ ໃຊ້ເວລາຫຼາຍ. ການເອົານ້ຳອອກດ້ວຍ ethanol ແລະ ການຖ່າຍຜ່ານ clove oil ອາດເຮັດໃຫ້ບາງຕົວຢ່າງກາຍເປັນອ່ອນໄວ ແລະ ແຕກງ່າຍ. ແມງຍິງຄົງເຮັດໃຫ້ໃບໄປໃສຕ່ຳໄປ ເຖິງຈະຊ້າຫຼາຍ; ນີ້ອາດເຮັດໃຫ້ຍາກທີ່ຈະເບິ່ງໂຄງສ້າງນ້ອຍໆ ເຊັ່ນ sensilla, ascoids, ແລະ simple setae.

ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ອາດເປັນແບບນ້ຳ (liquid), ອີງກຳ (gum-based), ຫຼື ອີງ resin ໄດ້, ລະລາຍໄດ້ໃນນ້ຳ, ເອທານອນ ຫຼື solvent ອື່ນໆ (ເຊັ່ນ toluene, xylene) (ຕາຕະລາງ 1). ເມື່ອນ້ຳໃຊ້ແລ້ວ ຄວນເຮັດການປະທັບ (sealed)

ດ້ວຍນ້ຳຢາປະທັບທີ່ບໍ່ລະລາຍ (non-soluble ringing media) ເພື່ອປູອາຍຸກັນການສຳຜັດກັບບັນຍາກາດ. ເພື່ອແຍກປະເພດຂອງນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລໃຫ້ຊັດເຈນ ສາມາດໃຊ້ການແບ່ງປະເພດດັ່ງຕໍ່ໄປນີ້:

a. ນ້ຳຢາແບບນ້ຳ (Aqueous media). ນ້ຳຢາເຫຼົ່ານີ້ລະລາຍງ່າຍໃນນ້ຳ ເໝາະສຳລັບການແຕ່ງສະໄລຊົ່ວຄາວ ຫຼື ກາງໆອາຍຸ (temporary or semi-permanent mounts). ປົກກະຕິງ່າຍຕໍ່ການຈັດການ ແຕ່ອາດຕ້ອງການການປະທັບເພື່ອປູອາຍຸກັນການສຳຜັດກັບຄວາມຊຸມຊື່ນ ໃນບັນຍາກາດ (ເຊັ່ນ gum-chloral media ແລະ polyvinyl alcohol) ໂດຍສະເພາະໃນເຂດຮ້ອນຊຸມຊື່ນ.

b. ນ້ຳຢາທີ່ທົນຕໍ່ນ້ຳໄດ້ຈຳກັດ (Limited water-tolerant media). ນ້ຳຢາເຫຼົ່ານີ້ຖືກສຳຜັດກັບນ້ຳໜ້ອຍກວ່າ ແຕ່ຍັງຕ້ອງການການປູອາຍຸກັນຄວາມຊຸມຊື່ນເກີນໄປ. ໃຫ້ຄວາມສະຖຽນທີ່ຍາວນານກວ່ານ້ຳຢາລະລາຍນ້ຳ ແລະ ນ້ຳໃຊ້ບ່ອຍໃນການແຕ່ງສະໄລກາງໆອາຍຸ.

c. ນ້ຳຢາລະລາຍໃນ hydrocarbon (Hydrocarbon-soluble media). ນ້ຳຢາເຫຼົ່ານີ້ລະລາຍໃນ solvent ອື່ນຊື່ເຊັ່ນ xylene ຫຼື toluene, ຫຼື essenecê (enecê solvent). ອອກແບບສຳລັບການແຕ່ງສະໄລຖາວອນ ແລະ ໃຫ້ຄວາມສະຖຽນທີ່ດີເລີດໃນໄລຍະຍາວ, ຕ້ານການຊຸມຊື່ນ ແລະ ການເສື່ອມສະພາບ ເໝາະສຳລັບການເກັບຮັກສາໄລຍະຍາວ (ເຊັ່ນ neutral Canada balsam, DPX).

ສະຫຼຸບ ນ້ຳຢາລະລາຍນ້ຳ ເໝາະທີ່ສຸດສຳລັບການແຕ່ງສະໄລຊົ່ວຄາວ ຫຼື ກໍລະນີທີ່ຕ້ອງການເອົາຕົວຢ່າງອອກງ່າຍ; ນ້ຳຢາທົນຕໍ່ນ້ຳໄດ້ຈຳກັດ ເໝາະສຳລັບການແຕ່ງສະໄລກາງໆອາຍຸທີ່ຕ້ອງການຄວາມທົນທານປານ ກາງ; ນ້ຳຢາລະລາຍໃນ hydrocarbon ເປັນທາງເລືອກທີ່ດີທີ່ສຸດສຳລັບການແຕ່ງສະໄລຖາວອນ ທີ່ຕ້ອງການເກັບຮັກສາໄລຍະຍາວ ແລະ ເປັນແຫຼ່ງອ້າງອີງ.

5.3.4. ຄຳອະທິບາຍກ່ຽວກັບນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ (mounting media) (ຕາຕະລາງ 3 & 4)

ນ້ຳຢາສຳລັບການສັງເກດຊົ່ວຄາວ

Chloral gum = Hoyer fluid/medium/solution (RI = 1.48). Marc André fluid ເປັນສານທີ່ດີທີ່ສຸດສຳລັບການສັງເກດໃນໄລຍະສັ້ນ (ບໍ່ຫລາຍຊົ່ວໂມງ ຫຼື ອາດຈະຍາວກວ່ານັ້ນ ຖ້າ ສະໄລຖືກເກັບໃນຫ້ອງຊຸມ) ສຳລັບການສັງເກດຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae), ລວມທັງການຖ່າຍຮູບ (ຮູບ 4) ຫຼື ການແຕ່ງຮູບ. ການຮັກສາ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae) ທີ່ໄດ້ສັງເກດແລ້ວ ຈຳເປັນຕ້ອງນຳມາແຕ່ງສະໄລໃໝ່ໃນນ້ຳຢາທີ່ເປັນນ້ຳ

ເພື່ອໃຫ້ສາມາດເກັບໄດ້ໃນໄລຍະກາງ. ການດຶງນ້ຳອອກ (dehydrate) ເພື່ອແຕ່ງສະໄລໃໝ່ໃນ resin ສາມາດເຮັດໄດ້ ແຕ່ບໍ່ແນະນຳ (ມີຄວາມສ່ຽງຕໍ່ການສູນເສຍ). Chloral gum ແລະ Hoyer fluid ຖືກພິຈາລະນາວ່າເປັນຄຳສັບທີ່ມີຄວາມໝາຍຄືກັນ.

ສານນີ້ຖືກນຳໃຊ້ບໍ່ຂາດໃນການສັງເກດອະວະຍະວະພາຍໃນ ເນື່ອງຈາກມັນເຂົ້າກັນໄດ້ກັບນ້ຳ, ໃຊ້ງານງ່າຍ, ເຮັດໄດ້ໄວ ແລະ ມີດັດຊະນີຫັກແສງ (refractive index) ທີ່ຊ່ວຍໃຫ້ການກວດເບິ່ງໂຄງສ້າງທີ່ບອບບາງ ເຊັ່ນ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae) ເຮັດໄດ້ງ່າຍ. ແຕ່ຢ່າງໃດກໍຕາມ chloral gum ມີຂໍ້ຈຳກັດສຳຄັນ

ຖ້າບໍ່ໄດ້ກຽມຫຼືເກັບຮັກສາໃນສະພາບຄວາມຊຸມທີ່ຄວບຄຸມໄດ້ດີ. ບັນຫາເຫຼົ່ານີ້ລວມມີ ການຕົກຕະກອນຄຣິສຕອນ, ການປຸງນສີ ແລະ ການສູນເສຍຄວາມໜົດ. ການປິດຂອບ ແຜນປົກສະໄລ coverslip (ringing) ບໍ່ສາມາດແກ້ໄຂບັນຫາເຫຼົ່ານີ້ໄດ້ ເນື່ອງຈາກ ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ ອາດຈະປຸງນສີເຂັ້ມຫຼາຍ (ບາງຄັ້ງເກືອບດຳ) ເນື່ອງຈາກປະຕິສຳພັນກັບສານທີ່ໃຊ້ປິດຂອບ ໂດຍສະເພາະຖ້າໃຊ້ Euparal®.

Hoyer medium ໄດ້ຖືກພິຈາລະນາວ່າເປັນນ້ຳຢາທີ່ດີທີ່ສຸດສຳລັບຮັ້ນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ ໄດ້ຖືກນຳໃຊ້ມາດັ່ງເດີມໃນຈຸດປະສົງນີ້. ສານນີ້ປະກອບມີສຸດຫຼາຍແບບທີ່ໃກ້ຄຽງກັນ ເຊັ່ນ gum arabic, glycerol ແລະ chloral hydrate. ສຸດຫຼາຍແບບໄດ້ຖືກເຂົ້າໃຈຜິດ ຫຼື ອ້າງອີງຜິດ [74].

ເຖິງແມ່ນວ່າ Hoyer ເປັນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ດີສຳລັບການສັງເກດ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ (spermathecae) ໃນຮັ້ນຝ່ອຍຊາຍ ແຕ່ມັນບໍ່ເໝາະສຳລັບການເກັບຮັກສາໃນໄລຍະຍາວ. ມັນເໝາະສຳລັບການສັງເກດໄລຍະສັ້ນ ເຊັ່ນ ການຖ່າຍຮູບ, ການແຕ່ງຮູບ ຫຼື ການບັນທຶກພາບ. ນ້ຳຢາຊະນິດເປັນນ້ຳເໝາະສຳລັບການແຕ່ງສະໄລຊົ່ວຄາວ ແຕ່ບໍ່ສາມາດຮັບປະກັນການເກັບຮັກສາໄດ້ໃນໄລຍະຍາວ. ກົງກັນຂ້າມ, ການແຕ່ງສະໄລດ້ວຍ resin ໃຫ້ຄວາມຄົງທົນສູງ ແລະ ອາດຈະຢູ່ໄດ້ເຖິງຫຼາຍຮ້ອຍປີ ແຕ່ອາດຈະເຮັດໃຫ້ລາຍລະອຽດຂອງ ຖືກເກັບນ້ຳເຊື້ອ ເຫັນໄດ້ບໍ່ຊັດ ເນື່ອງຈາກຄຸນສົມບັດການຫັກແສງຂອງແສງມັກຈະຫາຍໄປ.

Hoyer medium ຈະເສື່ອມສະພາບໄປຕາມເວລາ ເນື່ອງຈາກການສູນເສຍນ້ຳ (dehydration) (ຮູບ 8) ສິ່ງຜົນໃຫ້ເກີດການກໍ່ຕົວເປັນຄຣິສຕອນ chloral hydrate ສີຂາວ ແລະ ຊຸນ. ແຕ່ຢ່າງໃດກໍຕາມ ຕົວຢ່າງຍັງສາມາດກູ້ຄືນໄດ້ຈາກ ສະໄລ ທີ່ເກີດຄຣິສຕອນ ເນື່ອງຈາກ cuticle ຍັງຄົງສະພາບທາງເຄມີ ແມ່ນແຕ່ອາດຈະມີຄວາມເສຍຫາຍທາງກາຍະພາບບາງສ່ວນຈາກການເຕີ ບໄຕຂອງຄຣິສຕອນ. ໃນບາງກໍລະນີ ສະໄລ ທີ່ເກີດຄຣິສຕອນສາມາດຟື້ນຟູໄດ້ ໂດຍການເພີ່ມຄວາມຊຸມໃຫ້ ນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລໃນສະພາບອຸນ ແລະ ຊຸມ ພ້ອມກັບໃຊ້ thymol ເພື່ອປູອາຍຸກັນເຊື້ອຣາ. ອີກທາງເລືອກໜຶ່ງ ຄື ການແຊ່ຕົວຢ່າງອອກຈາກ gum chloral ໃນນ້ຳ, ຕາມດ້ວຍການ dehydrate ໃນ glacial acetic acid ແລະ ນຳໄປ ແຕ່ງໃໝ່ໃນ Canada balsam.

DMHF (diméthyl-hydantoïne formaldéhyde) (IR = 1.48)

ນ້ຳຢາທີ່ມີນ້ຳເປັນຖານນີ້ [72] ມີປະສິດທິພາບທາງ optical ດີຫຼາຍ ຄ້າຍຄືກັບ Berlese ແລະ ໃຊ້ງານງ່າຍເທົ່າກັນ. ແຕ່ຕ່າງຈາກ Berlese, ມັນບໍ່ປຸງເປັນສີດຳ ຫຼື ເກີດຄຣິສຕອນ. ມັນເໝາະສຳລັບ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ ແມງໃນວົງສະກຸນ Psychodidae ອື່ນໆ.

CMCP (camphre-mono-chlorophénol) (IR = 1.41)

ນີ້ແມ່ນນ້ຳຢາສຳລັບການແຕ່ງສະໄລທີ່ມີ glycerin ເປັນຖານ ແລະ ລະລາຍໃນນ້ຳ ໃຊ້ສຳລັບການແຕ່ງແຜ່ນແກວສະໄລແບບຖາວອນທີ່ໃສ ສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ບອບບາງ ລວມທັງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ. ຂໍ້ຄິດ ສາມາດ ແຕ່ງຕົວຢ່າງໄດ້ໂດຍກົງຈາກນ້ຳ ຫຼື ethanol. ມັນຊ່ວຍໃຫ້ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ຄາຍຕົວ ແລະ ໃສ ຢ່າງວ່ອງໄວ ໂດຍເຮັດໃຫ້ cuticle ອ່ອນລົງ ເພື່ອໃຫ້ຈັດຕຳແໜ່ງໄດ້ຖືກຕ້ອງ ເຊັ່ນ ການກະຈາຍປົກ ຫຼື ການຜ່າອະວະຍະວະເພດ.

ເຖິງແມ່ນວ່າມີການລາຍງານວ່າສາມາດເກັບໄດ້ໄລຍະຍາວ ແຕ່ໄລຍະເວລາທີ່ແນ່ນອນຍັງບໍ່ຊັດເຈນ. ຂໍ້ຈຳກັດຫຼັກຄື ມັນມີ phenol ເຊິ່ງເປັນສານພິດ ແລະ ລະຄາຍເຄືອງ ຕ້ອງໃຊ້ດ້ວຍຄວາມລະວັງ..

ນ້ຳຢາສຳລັບການ mount ແບບຖາວອນ

Canada balsam (IR = 1.52-1.54)

ນ້ຳຢານີ້ໄດ້ຖືກພັນລະນາວ່າເປັນນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລທີ່ເໝາະສຳລັບການສົ່ງ ສະທ້ອນແສງໃນກ້ອງຈຸລະທັດ ໂດຍ ທ່ານ Andrew Pritchard ໃນທົດສະວັດ 1830. ມັນຍັງເປັນນ້ຳຢາທີ່ນິຍົມໃຊ້ຫຼາຍ ເນື່ອງຈາກຄຸນນະພາບໃນການເກັບຮັກສາທີ່ດີ ແລະ ມີປະຫວັດການໃຊ້ງານກວ່າ 150 ປີ. ຕ່າງຈາກ Hoyer, ມັນບໍ່ເກີດຄຣິສຕອນ ຫຼື ດູດຊິມນ້ຳ. ແຕ່ມັນມີ autofluorescence ສູງ ເຊິ່ງອາດເປັນຂໍ້ຈຳກັດໃນບາງເຕັກນິກ microscopy [60]. ການໃຊ້ solvent ທີ່ບໍ່ມີພິດແທນ xylene ສາມາດຫຼຸດຄວາມສ່ຽງ ແຕ່ອາດເຮັດໃຫ້ແຫຼງຊ້າ ແລະ ປຸງເສີໄວຂຶ້ນ.

Euparal® (IR = 1.48); L'Euparal® Euparal®

ເປັນທາງເລືອກທີ່ນິຍົມແທນ Canada balsam ສຳລັບການແຕ່ງສະໄລແບບຖາວອນ ໂດຍມີຄວາມຄົງທົນໄລຍະຍາວທີ່ດີ ແລະ ອັດຕາການຫັກເຫແສງໃກ້ຄຽງກັນ. ມັນມີລັກສະນະສຳຄັນຄື: (1) ຕ້ອງມີການດຶງນ້ຳອອກກ່ອນ: ກ່ອນການແຕ່ງສຸດທ້າຍ ຕົວຢ່າງຕ້ອງຖືກຜ່ານເຫຼົ້າ ethanol ຈາກ 95% ໄປຫາ absolute ethanol; (2) ໃຊ້ເວລາດົນ: ການຈັດການໃນ resin ຈະເພີ່ມເວລາໃນການກະກຽມຕົວຢ່າງ. ຖ້າບໍ່ສາມາດ dehydrate ດ້ວຍ solvent ໄດ້ ສາມາດນຳຕົວຢ່າງຈາກ absolute ethanol ໄປໃສ່ນ້ຳຢາກາງ (mixture) ລະຫວ່າງ Euparal® ແລະ Euparal essence ກ່ອນການແຕ່ງສຸດທ້າຍ.

Enecé (IR = 1.467). Enecé ແມ່ນນ້ຳຢາ ແຕ່ງສະໄລ ທີ່ມີຢາງ resin ເປັນຖານ ໃຊ້ຫຼາຍສຳລັບແມງໄມ້ນ້ອຍ ແລະ ນິຍົມໃນປະເທດບຣາຊິນ. ສ່ວນປະກອບມີ colophony ແລະ gum copal ລະລາຍໃນ alcohol, camphor, essence of turpentine ແລະ eucalyptol. Cerqueira [11] ໄດ້ອະທິບາຍວ່າ Enecé ເປັນທາງເລືອກຂອງ Canada balsam ສຳລັບການແຕ່ງແຜ່ນແກວສະໄລແບບຖາວອນ ຂອງໜອນແມງໄມ້

(larvae), ຄາບແມງໄມ້ (exuviae) ແລະ ແມງກະທັ່ງຍຸງຕົວແກງ ແລະ ຕໍ່ມາຖືກນຳໃຊ້ຢ່າງກວ້າງຂວາງສຳລັບ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ. Enecé ເປັນທາງເລືອກທີ່ປະຢັດ ສຳລັບການແຕ່ງສະໄລແບບຖາວອນ ໂດຍໃຫ້ຄວາມຄົງທົນໄລຍະຍາວ ແລະ ເວລາແຕ່ງທີ່ເໝາະສົມ ເພື່ອໃຫ້ສາມາດຜ່າ ແລະ ຈັດຮູບໂຄງສ້າງຮູບຮ່າງໄດ້ຢ່າງແມ່ນຢາ.

5.4. ການກະກຽມແຜ່ນແກວສະໄລ ແລະ ການອົບແຫ້ງ

ການອົບແຫ້ງແຜ່ນແກວສະໄລຫຼັງຈາກການແຕ່ງສະໄລ ແມ່ນສິ່ງສຳຄັນຫຼາຍ ເພື່ອຮັບປະກັນຄວາມຄົງທົນ ແລະ ການເກັບຮັກສາໃນໄລຍະຍາວ. ແຜ່ນແກວສະໄລຄວນຖືກອົບໃຫ້ແຫຼງສົມບູນ ກ່ອນຈະນຳໄປເກັບຮັກສາ. ເພື່ອໄດ້ຜົນທີ່ດີ, ແຜ່ນແກວສະໄລທີ່ໃຊ້ນ້ຳຢາສຳລັບການແຕ່ງສະໄລແບບຖາວອນ ຄວນອົບແຫ້ງໃນທ່ານອນພຽງ 2-3 ອາທິດ, ສຳລັບນ້ຳຢາແບບເຄິ່ງຖາວອນ ອາດໃຊ້ເວລາ 1-2 ອາທິດ. ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ຖັງອົບ incubator ທີ່ຕັ້ງອຸນຫະພູມໃຫ້ເໝາະສົມ ກັບນ້ຳຢາທີ່ໃຊ້ ແລະ ຫຼີກລ້ຽງຄວາມຮ້ອນສູງເກີນໄປ ເພາະອາດທຳລາຍຕົວຢ່າງ. ອຸນຫະພູມທີ່ແນະນຳຄື 30-37°C. ຂັ້ນຕອນນີ້ສຳຄັນເພາະຊ່ວຍປຸງອາກາດຂອງແຜ່ນແກວສະໄລ, ການເສຍຫາຍຂອງຕົວຢ່າງ ຫຼື ຄວາມບໍ່ສະຖຽນຂອງນ້ຳຢາໃນໄລຍະການເກັບຮັກສາ.

ນ້ຳຢາທີ່ໃຊ້ໃນການແຕ່ງສະໄລຄວນຖືກບັນທຶກລົງໃນແຜ່ນແກວສະໄລສະເໝີ. ຖ້າເປັນໄປໄດ້ ຄວນບັນທຶກສູດທີ່ໃຊ້, ຊື່ຜູ້ກະກຽມ ແລະ ວັນທີກະກຽມ. ໃນຂັ້ນຕົ້ນ ແຜ່ນແກວສະໄລມັກຖືກກະກຽມເປັນແບບຊົ່ວຄາວ ແລະ ບໍ່ໄດ້ມຸ່ງເນັ້ນການເກັບຮັກສາຍາວ. ແຕ່ຖ້າສະຖານະຂອງຕົວຢ່າງປຸງໄປ (ເຊັ່ນ ກາຍເປັນອ້າງອີງ “type specimen”) ຄວນໃຊ້ນ້ຳຢາແບບຖາວອນເພື່ອຮັກສາສຳລັບການສຶກສາການຈຳແນກຊະນິດໃນອະນາຄົດ.

5.5. Techniques alternatives de montage : montage sur carte

Card mounting ແມ່ນວິທີທີ່ໃຊ້ກັບແມງໄມ້ຫຼາຍກຸ່ມ ໂດຍຕົວຢ່າງສາມາດຖືກປັກເຂັ້ມໃສ່ເຈ້ຍ ຫຼື ຕິດກາວໄວ້ດ້ານເທິງເຈ້ຍ. ແຕ່ເນື່ອງຈາກ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ມີຂະໜາດນ້ອຍ ແລະ ຈຳເປັນຕ້ອງສົ່ງເກດອະວະຍະວະພາຍໃນ (ເບິ່ງໃນຂໍ້ທີ 6) ວິທີນີ້ຈຶ່ງບໍ່ເໝາະສົມເລີຍກັບການຮັກສາຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ.

5.6. ການແຕ່ງສະໄລໃໝ່ສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ເສຍຫາຍ

ສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ຫາຍາກ ຫຼື ມີຄ່າ ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ວິທີ 2 ຂັ້ນຕອນ ຕາມວິດີໂອທີ່ເຂົ້າເຖິງໄດ້ທີ່:

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

1) ເພີ່ມຄວາມຊຸມ (rehydrate) ໂດຍບໍ່ແກະແຜ່ນແກວສະໄລ ເພື່ອໃຫ້ສາມາດສົ່ງເກດເບື້ອງຕົ້ນ.

ຄວນວາງທີ່ຈັບສຳລັບແຜ່ນແກວສະໄລຫຼາຍໆ ໃນ Petri dish ເພື່ອເປັນຖານຮອງ. ຈາກນັ້ນນຳແຜ່ນແກວສະໄລທີ່ຈະ rehydrate ວາງໄວ້ເທິງ ແລະ ເພີ່ມ solvent ປະມານບາງມິລິແມັດໃນ Petri dish ເພື່ອສ້າງຫ້ອງຊຸມ ໂດຍໃຫ້ແນ່ໃຈວ່າແຜ່ນແກວສະໄລບໍ່ໄດ້ສຳຜັດກັບ solvent (ຮູບ 8 D). ເວລາທີ່ໃຊ້ໃນການ rehydrate ອາດຈະແຕກຕ່າງຈາກ 1 ຫາຫຼາຍມື້ ຂຶ້ນກັບສະພາບຂອງຕົວຢ່າງ.

ການກວດສອບທຸກມື້ ແລະ ຄວາມອິດທິພົນແມ່ນສິ່ງສໍາຄັນ. ເມື່ອແຜ່ນແຖວສະໄລມີຄວາມຊຸມພຽງພໍແລ້ວ ສາມາດນໍາອອກຈາກຫ້ອງຊຸມ ແລະ ນໍາໄປວາງໃນ incubator ສອງສາມຊົ່ວໂມງ ກ່ອນການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ, ການຖ່າຍຮູບ ຫຼື ການແຕ່ງມູມຮູບ..

2) ເພື່ອການແຕ່ງສະໄລໃໝ່ ສາມາດນໍາແຜ່ນແຖວສະໄລກັບໄປຫ້ອງຊຸມອີກສອງສາມຊົ່ວໂມງ ຫຼື ຄ້າງຄືນ. ການແກະແຜ່ນແຖວສະໄລຄວນເຮັດພາຍໃຕ້ກ້ອງ binocular microscope. ໃຊ້ເຂັມລະອຽດ ເພື່ອເອົາ coverslip ອອກຢູ່ງາລະມັດລະວັງ ໂດຍໃຫ້ແນ່ໃຈວ່າບໍ່ມີສ່ວນໃດຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ຕິດຢູ່ (https://zenodo.org/records/18315029). ຈາກນັ້ນ ຄວນເກັບສ່ວນທີ່ຖືກຜ່າອອກ ແລະ ລ້າງດ້ວຍນໍ້າໃນຫຼຸມນ້ອຍ ຄ້າຍກັບທີ່ໃຊ້ໃນການສະກັດ DNA/RNA ແບບທໍາລາຍ (ດັ່ງລຸ້ນນີ້), ກ່ອນການ dehydrate ແລະ ການແຕ່ງສະໄລໃໝ່ໃນນໍ້າຢາປະເພດ resin. ໃນການແກະແຜ່ນແຖວສະໄລ ຈໍາເປັນຕ້ອງຮູ້ຊະນິດນໍ້າຢາທີ່ໃຊ້ເດີມ ເພື່ອເລືອກ solvent ໃຫ້ເໝາະສົມ. ສໍາລັບນໍ້າຢາປະເພດ aqueous ໃຫ້ໃຊ້ນໍ້າ. ຖ້າເປັນນໍ້າຢາປະເພດ resin (ເຊັ່ນ Canada balsam ຫຼື Euparal®) ຄວນໃຊ້ xylene ໂດຍເຮັດໃນ fume hood ແລະ ໃຊ້ອຸປະກອນປູ່ງຸກັນສ່ວນບຸກຄົນຢູ່ງາເໝາະສົມ ລວມທັງໜ້າກາກ. ການແຕ່ງສະໄລໃໝ່ຂອງ type specimen ຫຼື ຕົວຢ່າງໃນ collection ຕ້ອງໄດ້ຮັບການອະນຸຍາດຈາກ curator ຫຼື ສະຖາບັນເຈົ້າຂອງກ່ອນເທົ່ານັ້ນ.

6. ການຈໍາແນກຕົວຢ່າງ

6.1. ຮູບຮ່າງ (Morphology)

ການຈໍາແນກ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ພື້ນຖານແມ່ນອີງໃສ່ການກວດສອບລັກສະນະຮູບຮ່າງ (morphology) ເຊັ່ນ ຮູບຊົງຂອງເອິກ (thorax), ປີກ, ອະໄວຍະວະສືບພັນ (genitalia), ຂົນ (setae) ແລະ ຄວາມສໍາພັນທາງ morphometric ລະຫວ່າງໂຄງສ້າງຕ່າງໆ. ນັກວິທະຍາໃຊ້ taxonomic keys, ຄັງຕົວຢ່າງອ້າງອີງ (reference collections) ແລະ ຄໍາອະທິບາຍສາຍພັນດັ່ງເດີມ ເພື່ອປຽບທຽບຕົວຢ່າງທີ່ເກັບກັບ taxa ທີ່ຮູ້ຈັກແລ້ວ. ລັກສະນະສໍາຄັນສໍາລັບການຈໍາແນກ ປະກອບມີ ເສັ້ນປີກ (wing venation) ແລະ ຮູບຮ່າງຫົວ ທັງໃນເພດຜູ້ ແລະ ເພດຍິງ, ໂຄງສ້າງ genitalia ຂອງເພດຜູ້ ແລະ ຮູບແບບ spermathecae ຂອງເພດຍິງ. ການຈໍາແນກທີ່ແມ່ນຍໍາ ມັກຈະຕ້ອງໃຊ້ການກວດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ ໂດຍໃຊ້ compound microscope ເພື່ອເບິ່ງໂຄງສ້າງລະອຽດ (ເຊັ່ນ genitalia ແລະ spermathecae) ຫຼື stereomicroscope ສໍາລັບການເບິ່ງຮູບຮ່າງທົ່ວໄປ.

ໃນປັດຈຸບັນ ເທັກໂນໂລຊີການຖ່າຍຮູບໄດ້ຊ່ວຍໃຫ້ການຈໍາແນກມີຄວາມກ້າວໜ້າຂຶ້ນ . ຮູບຄວາມລະອຽດສູງ ຫຼື ຮູບວາດດິຈິຕອນຂອງລັກສະນະສໍາຄັນ ສາມາດນໍາໄປປຽບທຽບກັບຂໍ້ມູນອ້າງອີງ ຫຼື

ວິເຄາະດ້ວຍລະບົບຄອມພິວເຕີ ເພື່ອເພີ່ມຄວາມແມ່ນຍໍາ ແລະ ຄວາມສະດວກໃນ ການຈໍາແນກຊະນິດ.

6.2. ຮູບຊົງເລຂາຄະນິດຂອງປີກ (Wing geometry)

ຮູບຮ່າງປີກແມ່ນລັກສະນະສໍາຄັນ ທີ່ໃຊ້ໃນການຈໍາແນກ ແລະ ຈັດປະເພດຂອງ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ແຕ່ລະສາຍພັນ. ປີກຂອງພວກມັນມີຮູບແບບສະເພາະ ໂດຍທົ່ວໄປຈະຍາວ ແລະ ແຄບ ພ້ອມກັບມີເສັ້ນປີກ (venation) ທີ່ພັດທະນາດີ (ຮູບ 9 & 10).

ການຈັດຮຽງຂອງເສັ້ນປີກຈະສ້າງຮູບແບບສະເພາະ ທີ່ອາດແຕກຕ່າງກັນລະຫວ່າງ genus ແລະ species ເຮັດໃຫ້ເປັນຈຸດຊີ້ນໍາສໍາຄັນໃນການຈໍາແນກ. ດັ່ງນັ້ນ ການສຶກສາຮູບຮ່າງປີກຈຶ່ງມີປະໂຫຍດຫຼາຍໃນດ້ານອານຸກົມວິຖານ (taxonomy).

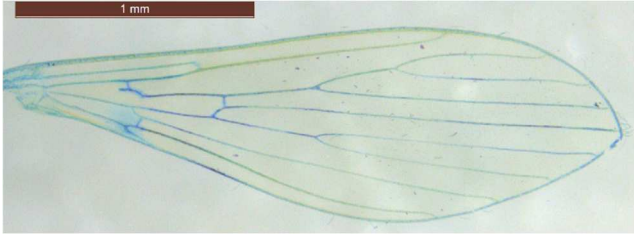
6.3. ການວັດແທກທາງເລຂາຄະນິດຂອງປີກ (Wing geometric morphometrics)

ນັກຄົ້ນຄ້ວາໃຊ້ຫຼາຍວິທີ ເຊັ່ນ ການວັດແທກທາງເລຂາຄະນິດຂອງປີກ ເພື່ອວິເຄາະ ແລະ ປຽບທຽບຮູບຮ່າງ ແລະ ຂະໜາດຂອງປີກ ໃນ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ ສາຍພັນ ຫຼື ປະຊາກອນທີ່ແຕກຕ່າງກັນ. ການສຶກສານີ້ຍັງຊ່ວຍໃຫ້ເຂົ້າໃຈພຶດຕິກຳ, ຄວາມມັກທີ່ຢູ່ອາໄສ (habitat preferences) ແລະ ຄວາມສາມາດໃນການບິນ.

ໃນວິທີ geometric morphometrics ປີກຈະຖືກຜ່າຕັດອອກຢູ່ງາລະມັດລະວັງ, ຍ້ອມສີ (ຖ້າຈໍາເປັນ) ແລະ ແຕ່ງສະໄລໃຫ້ແບບແຕ່ອອກໃນແຜ່ນແຖວສະໄລ. ຫຼັງຈາກນັ້ນ ຈະຖ່າຍຮູບດ້ວຍ stereomicroscope, ແປງເປັນຂໍ້ມູນດິຈິຕອນ ແລະ ນໍາໄປວິເຄາະ morphometric. ວິທີນີ້ໄດ້ຖືກອະທິບາຍຢ່າງກວ້າງຂວາງໃນເອກະສານອ້າງອີງ [6, 27, 42, 56, 57, 59] ແລະ ແນະນໍາໃຫ້ໃຊ້ປີກຂ້າງດຽວ (ຊ້າຍ ຫຼື ຂວາ) ຢູ່ງາສະໝໍາເໝີ ເພື່ອຫຼີກລ້ຽງຜົນກະທົບ allometric ທີ່ອາດເກີດຂຶ້ນ [62].



ຮູບ 9: ປີກສີດຂອງ *Trichophoromyia ininii*.



ຮູບ 10: ປີກທີ່ຍ້ອມສີຂອງ *Phlebotomus ariasi*.

ການກະກຽມປີກສໍາລັບການວິເຄາະການວັດແທກທາງເລຂາຄະນິດຂອງປີກ

ເພື່ອການສັງເກດເສັ້ນປີກໃຫຼ່ໄດ້ດີທີ່ສຸດ, ປີກຄວນໄດ້ຮັບການເຮັດຄວາມສະອາດເອົາເກັດອອກ ແລະ ຍ້ອມສີຢູ່ເໝາະສົມ. ສໍາລັບການກະກຽມປີກ, ກ່ອນອື່ນໃສ່ນໍ້າຢາທີ່ຕ້ອງການໃນຮູບນ້ອຍໆ (methylene blue, ethanol, ນໍ້າ ແລະ xylene substitute). ເອົາປີກທີ່ເກັບໄວ້ໃນ ethanol 70% ໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງໂດຍປູງຽນຫົວ Eppendorf tube ແລະ ເອົາອອກລົງໃນຮູ, ຫຼັງຈາກນັ້ນຍົກປີກຕາມ ລວງຍາວດ້ວຍເຂັມໂຄງນ້ອຍ. ຖ່າຍປີກຜ່ານ ethanol ໄປນໍ້າ ແລະ ກັບມາ ethanol ອີກຄັ້ງເພື່ອກໍາຈັດຂົນ. ໃສ່ປີກໃນ methylene blue ເປັນເວລາ 6 ນາທີ ໂດຍຮັບປະກັນວ່າມັນລອຍຢູ່ໃນລະຫວ່າງການທາສີ. ເອົາປີກອອກຢູ່ລະມັດລະວັງ ແລະ ຈຸມໃນ xylene substitute ເປັນເວລາ 2 ນາທີ (ປະມານ 1/3 ຂອງເວລາ methylene blue). ການເຕັ້ນເຂັມເປົາງກັບຝາຮູ ສາມາດຊ່ວຍໃຫ້ປີກຕັ້ງຄົງ; xylene ຊ່ວຍໃຫ້ສີຄົງຕົວ. ສຸດທ້າຍ ຍົກປີກ ແລະ ວາງໃນນໍ້າເຫດນ້ອຍຂອງ Euparal® ໃນແຜນແຖວຈຸລະທັດ. ພາຍໃຕ້ເລນຂະຫຍາຍ, ກະຈາຍປີກອອກຢູ່ອ່ອນໆ ແລະ ວາງແຜນປີກຢູ່ລະມັດລະວັງ. ຄວນຖ່າຍຮູບທັນທີກ່ອນ Euparal® ແຂງ ເພາະອາດຕ້ອງການປັບຕໍາແໜ່ງປີກເລັກນ້ອຍໃຕ້ແຜນປີກເພື່ອໃຫ້ໄດ້ການຈັດຕໍາແໜ່ງທີ່ດີທີ່ສຸດ.

6.4. ເຕັກນິກທາງດ້ານຊີວະໂມເລກຸນ

ນອກເໜືອຈາກເຕັກນິກທາງດ້ານຮູບຮ່າງ, ວິທີການທາງດ້ານໂມເລກຸນກໍາລັງກາຍເປັນສິ່ງຈໍາເປັນເພີ່ມຂຶ້ນໃນການຄົ້ນຄວ້າດ້ານ ແມງໄມ້ວິທະຍາລວມທັງການສຶກສາ ການຈໍາແນກຊະນິດ, ພັນທຸກໍາດ້ານປະຊາກອນ (population genetic), ແລະ ການສຶກສາ phylogenetic, ພ້ອມກັບການກວດຫາ DNA/RNA ຂອງເຊື້ອພະຍາດ, ແລະ ການຊອກຫາຊະນິດຂອງເລືອດທີ່ມັນກິນ, ເຊິ່ງພຶດຕິກຳຂອງພາຫະນໍາເຊື້ອແມ່ນມີຄວາມສໍາຄັນໃນຂະແໜງລະບາດວິທະຍາ [70]. ການລຽງລຳດັບກໍາມະພັນ DNA ສາມາດນໍາໃຊ້ເພື່ອຢືນຢັນຊະນິດ ຫຼື ແຍກຊະນິດທີ່ກ່ຽວຂ້ອງໂກ້ຄຽງກັນ ເພື່ອໃຫ້ຜົນການຈໍາແນກທີ່ຖືກຕ້ອງ ແລະ ເຊື່ອຖືໄດ້ຫຼາຍ ກວ່າ. ຍິ່ງໄປກ່ວານັ້ນ, ເຕັກນິກໂມເລກຸນຂັ້ນສູງ (ເຊັ່ນ PCR, DNA sequencing, NGS, ແລະ ອື່ນໆ) ແລະ MALDI-ToF MS ກໍາລັງໄດ້ຮັບຄວາມນິຍົມເພື່ອການຈໍາແນກຊະນິດທີ່ຖືກຕ້ອງ ແລະ ໄວ ເປັນການເສີມສ້າງເຕັກນິກ ທາງດ້ານຮູບຮ່າງແບບດັ້ງເດີມ [46]. ເຖິງຢູ່ໃດກໍ່ຕາມ ການຈໍາແນກດ້ວຍຮູບຮ່າງຍັງຄົງເປັນມາດຕະຖານ

ອ້າງອີງສໍາລັບການຈໍາແນກຊະນິດ ແລະ ເປັນພື້ນຖານສໍາລັບການອ່ານຜົນຂໍ້ມູນທາງດ້ານໂມເລກຸນ.

6.4.1. ການສະກັດ nucleic acid ແບບທໍາລາຍຕົວຢ່າງ (Destructive nucleic acid extraction)

ການສະກັດສານພັນທຸກໍາ nucleic acid ເປັນຂັ້ນຕອນທີ່ໃຊ້ປະຈໍາໃນການສຶກສາທາງຊີວະວິທະຍາຫຼາຍໆຢູ່ ແລະ ມີວິທີການ ຕ່າງໆໄດ້ຖືກພັດທະນາຂຶ້ນເພື່ອແຍກ DNA ອອກຈາກວັດສະດຸທາງຊີວະ [48]. ຊຸດການສະກັດ DNA ທີ່ຊື່ຂາຍທາງການຄ້າຫຼາຍໆຊຸດ ໄດ້ຖືກອອກແບບເພື່ອຊ່ວຍໃນການດໍາເນີນງານໃນຂັ້ນຕອນນີ້ [14]. ເຖິງຢູ່ໃດກໍ່ຕາມ ວິທີການທີ່ນໍາໃຊ້ທົ່ວໄປໃນການກະກຽມຕົວຢ່າງ ແມງໄມ້ຕີນຂໍ ສໍາລັບການຈໍາແນກດ້ວຍ ຮູບຮ່າງ ມັກຈະຂັດຂວາງການວິເຄາະ DNA ເພາະເຕັກນິກເຫຼົ່ານີ້ອາດເຮັດໃຫ້ເສຍຫາຍ ຫຼື ທໍາລາຍລັກສະນະທາງກາຍພາບສໍາຄັນຂອງຕົວຢ່າງ [10]. ໂປຣໂຕຄອນການສະກັດ DNA ສ່ວນໃຫຍ່ສໍາລັບເນື້ອເຍື່ອແມງ ເປັນແບບທໍາລາຍ [43] ເຊິ່ງເຮັດໃຫ້ເກີດຄວາມກັງວົນເປັນພິເສດກັບຕົວຢ່າງຂະໜາດນ້ອຍ ທີ່ການສໍາຫຼວດແບບຈໍາກັດກໍ່ອາດເຮັດໃຫ້ເສຍຫາຍລັກສະນະ ຮູບຮ່າງສໍາຄັນ [72]. ປະເພດ ແລະ ສະພາບຂອງຕົວຢ່າງ ມີບົດບາດສໍາຄັນໃນການເລືອກວິທີການສະກັດ DNA ທີ່ເໝາະສົມ [29].

ຄວາມຕ້ອງການການຈໍາແນກຊະນິດຂອງຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຖືກຕ້ອງ, ການເຂົ້າໃຈພັນທຸກໍາທາງດ້ານປະຊາກອນ, ແລະ ການຫຼຸດຜ່ອນຜົນກະທົບຕໍ່ເປົ້າໝາຍອື່ນ ໄດ້ຂັບເຄື່ອນການພັດທະນາເຄື່ອງມືການກວດທາງດ້ານໂມເລກຸນ [23]. ວິທີການທາງດ້ານໂມເລກຸນ ປັດຈຸບັນນໍາໃຊ້ເປັນປະຈໍາເພື່ອເສີມສ້າງເຕັກນິກການຈໍາແນກຊະນິດດ້ວຍຮູບຮ່າງໃນການຈໍາແນກ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ. ຕົວຢ່າງ, ວິທີມາດຕະຖານສໍາລັບ insect barcoding ກ່ຽວຂ້ອງກັບການສະກັດ DNA, sequencing, ແລະ ການສູນເສຍຕົວຢ່າງດັ້ງເດີມ. ດັ່ງນັ້ນ ມີຄວາມຕ້ອງການດ້ານການຄົ້ນຄວ້າວິທີການສະກັດ DNA ແບບບໍ່ທໍາລາຍ (non-destructive) ທີ່ຮັກສາທັງວັດສະດຸທາງຊີວະ ແລະ ຄວາມສົມບູນຂອງ ຮູບຮ່າງ ໄວ້.

ມີວິທີການສະກັດ nucleic acid ຫຼາຍຢ່າງທີ່ນໍາໃຊ້ກັບຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ. ປະລິມານ ຫຼື ຄຸນນະພາບຂອງ nucleic acid ທີ່ຕ້ອງການ ຂຶ້ນກັບການວິເຄາະໂມເລກຸນຕໍ່ໄປ ເພາະເຕັກນິກຕ່າງໆມີຄວາມອ່ອນໄຫວ ແລະ ຄວາມບໍລິສຸດທີ່ແຕກຕ່າງກັນ [9]. ຕົວຢ່າງ, ຕາ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ໄດ້ຖືກພົບວ່າຍັບຍັ້ງການຂະຫຍາຍ PCR [69]. ນອກເໜືອຈາກການສະແກນ pathogen, DNA ຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍຖືກສະກັດເປັນປະຈໍາເພື່ອການຈໍາແນກຊະນິດ. ສາມາດນໍາໃຊ້ວິທີການສະກັດຕ່າງໆໄດ້ ເຖິງວ່າຜົນໄດ້ຮັບ ແລະ ຄຸນນະພາບຈະແຕກຕ່າງກັນ. ບາງໂປຣໂຕຄອນຂອງຜູ້ຜະລິດໄດ້ຖືກປັບໃຊ້ໂດຍນັກຄົ້ນຄວ້າສໍາລັບຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ [8] ເພື່ອເພີ່ມຜົນໄດ້ຮັບ ແລະ/ຫຼື ຄຸນນະພາບຂອງ nucleic acid ທີ່ສະກັດໄດ້ [8, 9, 69] ໃນຂະນະທີ່ການປັບໃຊ້ອື່ນໆ ທີ່ພັດທະນາສໍາລັບ ແມງໄມ້ຕີນຂໍ ອື່ນໆ ກໍ່ສາມາດນໍາໃຊ້ກັບຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ໄດ້ [58, 76]. PCR ສໍາລັບການຈໍາແນກທີ່ເປົ້າໝາຍຊັ້ນ mitochondrial ນ້ອຍ (COI ຫຼື CytB) ປົກກະຕິເຂົ້າກັນໄດ້ກັບວິທີການສະກັດທີ່ເກີດການ fragment DNA

ສູງ. ກົງກັນຂ້າມ ແຕ່ກນິກ NGS ອ່ານຍາວອື່ນໆ (Oxford Nanopore ແລະ PacBio) ຕ້ອງການການ fragment ນ້ອຍທີ່ສຸດ ແລະ DNA ຄຸນນະພາບສູງ. ການສະກັດດ້ວຍ spin column ປົກກະຕິໃຫ້ genomic DNA fragment ສູງສຸດ 60 kb ໃນຂະນະທີ່ phenol-chloroform ສາມາດຜະລິດ fragment ສູງສຸດ 150 kb [77]. ຕາຕະລາງ 5 ສະຫຼຸບວິທີການສະກັດ DNA ຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ແຕກຕ່າງກັນ ແລະ ຊີ້ບອກວ່າມີການປັບໂປຣໂຕຄອນໃດໃຫ້ເໝາະ ກັບແມງໄມ້ນ້ອຍເຫຼົ່ານີ້ຫຼືບໍ່. ຜົນໄດ້ຮັບບໍ່ໄດ້ສະແດງ ເພາະຂຶ້ນກັບຂະ ໜາດຕົວຢ່າງ ແລະ ວິທີກະກຽມ. ຖັງ "modification" ອ້າງເຖິງການປັບໂປຣໂຕຄອນການສະກັດສໍາລັບ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ຫຼື ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່ ນ້ອຍອື່ນໆ.

ການເລືອກວິທີການສະກັດ ຄວນພິຈາລະນາຫຼາຍເງື່ອນໄຂ ເຊັ່ນ ຈໍານວນຕົວຢ່າງ, ໄລຍະເວລາສະກັດ, ແລະ ແຕ່ກນິກທີ່ນໍາໃຊ້ຕໍ່ໄປ. ເຖິງວ່າແຕ່ກນິກ NGS ຕ້ອງການ genomic DNA ທີ່ມີນໍ້າໜັກໂມເລກູນສູງ ແຕ່ວິທີການທີ່ນໍາສະເໜີທັງໝົດນີ້ ສາມາດນໍາ ໃຊ້ກັບການນໍາໃຊ້ PCR ມາດຕະຖານໄດ້.

ນອກຈາກນີ້ ຍັງໄດ້ມີການສຶກສາຢ່າງຫຼວງຫຼາຍ ເພື່ອທົດລອງໃຊ້ວິທີການສະກັດ DNA ແບບບໍ່ທໍາລາຍ ສໍາລັບ ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່ ຂະໜາດນ້ອຍເທິງພື້ນດິນອື່ນໆ, ຕົວຢ່າງໃນພິພິດະພັນທີ່ເກັບແຫຼ່ງ, ແລະ ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່ ທີ່ມີຮ່າງກາຍອ່ອນ [19, 26, 28, 55, 63].

6.4.2. ການສະກັດ nucleic acid ແບບບໍ່ທໍາລາຍຕົວຢ່າງ (Non-destructive nucleic acid extraction)

ໜຶ່ງໃນບັນຫາຫຼັກໃນການວິເຄາະໂມເລກູນຂອງ ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່, ໂດຍສະເພາະ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ, ຄືການຮັກສາຕົວຢ່າງເພື່ອນໍາໄປສົມທົບກັບ ຊຸດເກັບສະສົມທາງດ້ານແມງໄມ້ວິທະຍາ. ໂປຣໂຕຄອນການສະກັດ DNA ສ່ວນໃຫຍ່ຕ້ອງການ maceration ເນື້ອເຍື່ອ, ເຮັດໃຫ້ການຮັກສາຕົວຢ່າງດັ້ງເດີມຖືກທໍາລາຍ. ວິທີການສະກັດ nucleic acid ແບບບໍ່ທໍາລາຍ ກໍ່ຖືກອອກແບບຂຶ້ນເພື່ອສະກັດສານ ພັນທຸກໍາ ໂດຍບໍ່ເຮັດໃຫ້ຕົວຢ່າງເສຍຫາຍທາງກາຍພາບ, ບໍ່ສົ່ງຜົນກະທົບ ຕໍ່ການມີຊີວິດ ຫຼື ປຸງຮຸນແປງຮູບຮ່າງ. ວິທີນີ້ມີຄຸນຄ່າໂດຍສະເພາະ ເມື່ອເຮັດກັບຕົວຢ່າງທີ່ມີຄ່າ ຫຼື ມີຈໍາກັດ ເຊັ່ນ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ການຮັກສາຄວາມສົມບູນຂອງໂຄງສ້າງ ຈໍາເປັນຕໍ່ການ ການຈໍາແນກຊະນິດ, ຮູບຮ່າງ ຫຼື ການການກວດຫາໃນອະນາຄົດ. ແຕ່ກນິກທີ່ນໍາໃຊ້ທົ່ວໄປຄືການແຊບແບບບໍ່ທໍາລາຍ (non-destructive bathing method) ໂດຍ immobilize ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ແລະ ຈຸມອ່ອນໆໃນ lysis buffer ທີ່ມີ proteinase K.

ແຕ່ກນິກ mild-vectolysis ໄດ້ນໍາໃຊ້ສໍາເລັດກັບ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ, ໂດຍສະເພາະຕົວຢ່າງປະເພດ [24]. ແຕ່ກນິກນີ້ນໍາໃຊ້ spin column kit ທົ່ວໄປ (ໃນກໍລະນີນີ້ຄື DNeasy Blood and Tissue kit, QIAGEN, Hilden, Germany) ດ້ວຍການປັບໃຊ້ເພື່ອສະກັດ DNA ໂດຍບໍ່ທໍາລາຍຕົວຢ່າງ. ຂັ້ນຕອນ lysis ທີ່ປັບແລ່ວ (ປະລິມານ lysis buffer ແລະ ການເພີ່ມຂັ້ນຕອນ freezing) [17] ອະນຸຍາດໃຫ້ປູອຍ nucleic acid ອອກ ໃນຂະນະທີ່ຫຼຸດການເສຍຫາຍ ຮູບຮ່າງ [24]. ກ່ຽວກັບ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ, ຍັງສາມາດນໍາໃຊ້ HotSHOT DNA Extraction kit (Bento Bioworks Ltd, London, United

Kingdom) [73] ທີ່ໄວ ແລະ ລາຄາຖາ ເຮັດໃຫ້ການປະມວນຜົນຕົວຢ່າງໄວ ແລະ ຄ່າໃຊ້ຈ່າຍຕໍ່າ. ຕົວຢ່າງ entomological ທີ່ຕ້ອງການໃຊ້ສໍາລັບການຈໍາແນກ ຮູບຮ່າງ ສາມາດລ້າງຫຼັງການປະມວນຜົນ. ຕົວຢ່າງທີ່ປະມວນຜົນດ້ວຍ DNeasy Blood and Tissue kit ຕ້ອງເຮັດໃຫ້ໂປຼງໃສດ້ວຍນໍ້າ Marc-André, ໃນຂະນະທີ່ຕົວຢ່າງທີ່ປະມວນຜົນດ້ວຍ HotSHOT DNA extraction kit ໂປຼງໃສພຽງພໍທີ່ຈະແຕ່ງສະໄລໃນ medium ນໍ້າ, ຫຼື ດຶກວ່າແມ່ນໃນ resin ຫຼັງການເອົານໍ້າອອກ ຕາມໂປຣໂຕຄອນທີ່ອະທິບາຍໃນເອກະສານນີ້ [73]. ວັດສະດຸພັນທຸກໍາ ທີ່ສະກັດໄດ້ ສາມາດນໍາໄປປະມວນຜົນຕໍ່ເພື່ອການວິເຄາະຕໍ່ໄປ ເຊັ່ນ PCR ເພື່ອຂະຫຍາຍ genetic markers ພິເສດ. ວິທີການສະກັດ nucleic acid ແບບບໍ່ທໍາລາຍ ມີຄວາມສໍາຄັນຕໍ່ການສຶກສາລັກ ສະນະພັນທຸກໍາຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ລວມທັງການຈໍາແນກເຊື້ອພະຍາດທີ່ອາດມີ. ໂດຍການຮັກສາຄວາມສົມບູນຂອງຕົວຢ່າງ, ນັກຄົ້ນຄວ້າສາມາດໄດ້ຂໍ້ມູນພັນທຸກໍາທີ່ມີຄ່າ ໃນຂະນະທີ່ຮັກສາຕົວຢ່າງ ໄວ້ສໍາລັບການວິເຄາະ ຫຼື ການສຶກສາເພີ່ມເຕີມ.

6.5. MALDI-ToF MS

MALDI-ToF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) ເປັນແຕ່ກນິກທີ່ອີງໃສ່ mass spectrometry ອອກແບບມາເພື່ອກວດຫາ ແລະ ວິເຄາະຮູບແບບໂປຣຕິນ ທີ່ເປັນເອກະ ລັກຂອງຕົວຢ່າງທາງຊີວະ. MALDI-ToF ກໍາລັງຖືກຍອມ ຮັບເປັນ ເຄື່ອງມືສໍາຄັນສໍາລັບການຈໍາແນກ ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່ ທີ່ມີຄວາມສໍາຄັນທາງ ການແພດ ແລະ ສັດຕະວະແພດ. ແຕ່ກນິກນີ້ໄດ້ພິສູດປະສິດທິພາບ ໃນການຈໍາແນກຂັ້ນຕອນການເຕີບໂຕຕ່າງໆຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ລວມ ທັງຮູບແບບ immature ແລະ blood meal ຂອງຕົວແມ່ ທີ່ມີເລືອດເຕັມ, ແລະ ໄດ້ນໍາໃຊ້ສໍາເລັດໃນການແຍກຊະນິດ ຮິ່ນຝ່ອຍ ຊາຍ ຕົວຜູ້ ແລະ ຕົວແມ່ ພາຍໃຕ້ເງື່ອນໄຂການເກັບຮັກສາ ແລະ homogenization ທີ່ແຕກຕ່າງກັນ [28, 30, 73, 74]. ວິທີນີ້ຍັງໃຫ້ພະລັງການແຍກທີ່ສູງຢູ່ລະດັບ subgenus, ຊະນິດ, ແລະ ປະຊາກອນ. ແຕ່ກນິກນີ້ອະນຸຍາດໃຫ້ນັກຄົ້ນຄວ້າໄດ້ຮັບການຈໍາແນກ ຊະນິດໄດ້ໄວ ແລະ ຖືກຕ້ອງ ເຊິ່ງຈໍາເປັນສໍາລັບການເຂົ້າໃຈການກະ ຈາຍຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ, ພຶດຕິກໍາ, ແລະ ບົດບາດໃນການຕິດຕໍ່ພະຍາດ. ດ້ວຍການແຍກຊະນິດຕາມຮູບແບບໂປຣຕິນ, MALDI-ToF ມີບົດ ບາດສໍາຄັນໃນການສຶກສາດ້ານລະບາດວິທະຍາ ແລະ ຍຸດທະສາດການຄວບຄຸມພາຫະນໍາເຊື້ອ. ປັດຈຸບັນມີຂໍ້ຈໍາກັດ 2 ຢ່າງຫຼັກຂອງແຕ່ກນິກນີ້ທີ່ຈໍາກັດການນໍາໃຊ້ເປັນປະຈໍາ. ປະການທໍາອິດຄືຄວາມພ້ອມໃຊງານຂອງເຄື່ອງ mass spectrometry ທີ່ມີລາຄາແພງຫຼາຍ ຈົນເຮັດໃຫ້ຍາກທີ່ຈະຊື້ມາໃຊ້ ເພື່ອຈໍາແນກຊະນິດ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ (ຫຼື ພາຫະແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ່ ທົ່ວໄປ). ໂຊກດີທີ່ຂໍ້ຈໍາກັດນີ້ສາມາດແກ້ໄຂໄດ້ດ້ວຍການໃຊ້ເວລາເຄື່ອງ mass spectrometer ທີ່ກາຍເປັນເຄື່ອງມືມາດຕະຖານໃນໂລກ proteomic ແລະ/ຫຼື ການການກວດຫາດ້ານຄລິນິກ. ຂໍ້ຈໍາກັດທີສອງຄືການຂາດຂໍ້ມູນອ້າງອີງຂອງ ຮິ່ນຝ່ອຍຊາຍ ໃນຖານຂໍ້ມູ ນເປີດ ເຮັດໃຫ້ຕ້ອງສ້າງຖານຂໍ້ມູນພາຍໃນເອງພ້ອມກັບ reference spectra ຈາກຕົວຢ່າງທີ່ຈໍາແນກໄດ້ຢ່າງຊັດເຈນ ໂດຍດີທີ່ສຸດແມ່ນ ປະສົມການປະເມີນ ຮູບຮ່າງ ກັບ sequencing ຂອງ genetic

marker ທີ່ເໝາະສົມ (COI, cytB, ຫຼື ອື່ນໆ). ຂໍ້ຈຳກັດນີ້ຄາດວ່າຈະໄດ້ຮັບການແກ້ໄຂໃນໄວ້ນີ້ ດ້ວຍການປະກອບຂໍ້ມູນອ້າງອິງຂອງ ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຍັງຢູ່ພາຍໃນເຂົ້າໃນ MSI Platform ທີ່ດຳເນີນໂດຍ Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Sorbonne University, France ແລະ ຊຸດສະສົມ BCCM/IHEM/Sciensano ທີ່ Brussels, Belgium. ເມື່ອວາງແຜນນຳໃຊ້ MALDI-ToF protein profiling, ຕົວຢ່າງຄວນເກັບແຊງແຂງແຫຼງ ຫຼື ໃນເອທານອນ 70% ຄຸນນະພາບໂມເລກຸນ ແລະ ບໍ່ສຳຜັດກັບອຸນຫະພູມຫ້ອງ. ໃນຖ້າບໍ່ມີຂໍ້ກຳນົດສາກົນສຳລັບການກະກຽມຕົວຢ່າງ, ຜູ້ໃຊ້ຄວນນຳໃຊ້ນ້ຳຢາ aqueous 60% acetonitrile/0.3% TFA ຂອງ sinapinic acid (30 mg/mL) ສຳລັບການກະກຽມ matrix MALDI-ToF ເພື່ອໃຫ້ຮູບແບບໂປຣຕິນເປັນເອກະລັກກັບຂໍ້ມູນທີ່ຖືກເຜີຍແຜ່ຂອງ ຮິນຝ່ອຍຊາຍ ທີ່ຜ່ານມາ.

acid.

7. ສະຫຼຸບ

ໃນການຄົ້ນຄວ້ານີ້, ພວກເຮົາມີຈຸດປະສົງເພື່ອສະໜອງນັກຄົ້ນຄວ້າ ດ້ວຍວິທີການທີ່ມີປະສິດທິພາບທີ່ສຸດສຳລັບການແຕ່ງສະໄລ ຮິນຝ່ອຍຊາຍທີ່ປັບໃຊ້ກັບຈຸດປະສົງການຄົ້ນຄວ້າພິເສດ ເພື່ອຊ່ວຍໃຫ້ການຈຳແນກຊະນິດ ແລະ ການກວດຫາເຊື້ອພະຍາດຖືກຕ້ອງ. ບໍ່ມີວິທີດຽວທີ່ເໝາະສົມສາກົນ; ມີຫຼາຍວິທີ, ແຕ່ລະວິທີມີຂໍ້ດີ ແລະ ຂໍ້ເສຍຂອງຕົນເອງ.

ໃນຂໍ້ມູນເພີ່ມເຕີມ, ພວກເຮົາໄດ້ສະໜອງໂປຣໂຕຄອນລະອຽດສຳລັບເຕັກນິກການແຕ່ງສະໄລຕ່າງໆທີ່ນຳໃຊ້ໃນການກະກຽມ ແລະ ການຈຳແນກຮິນຝ່ອຍຊາຍ. ໂປຣໂຕຄອນເຫຼົ່ານີ້, ລວມທັງວິດີໂອສອນ, ໃຫ້ຂັ້ນຕອນລະອຽດທີ່ປັບໃຊ້ກັບຈຸດປະສົງຕ່າງໆ ເພື່ອຮັບປະກັນຜົນທີ່ຊັດ

ຕາຕະລາງ 5: ຄ່າໃຊ້ຈ່າຍສະເລ່ຍ, ການນຳໃຊ້, ແລະ ການບັບໂປຣໂຕຄອນ ສຳລັບການສະກັດສາມພັນທຸກໆ gDNA ຂອງ ຮິນຝ່ອຍຊາຍ

ຂັ້ນຕອນວິທີການ(Protocol)	ລາຄາ	ການນຳໃຊ້	ການບັບປຸງຂັ້ນຕອນວິທີການສຳລັບແມງໄມ້ຕີນຂໍ້ນ້ອຍ
Colonnes de silice	2,5 – 3,55 US\$ [39]	PCR, NGS	[9]
Phénol–chloroforme	0,24 US\$ [69]	PCR, NGS	[9]
HotSHOT	< 0,01 US\$ [69]	PCR	-
Salage	0,12 US\$ [69]	PCR	-
Chelex	0,02 US\$ [41]	PCR	[41, 76]

ການກະກຽມຕົວຢ່າງສຳລັບ MALDI-ToF MS (ຮູບທີ 7)

ຕົວຢ່າງແມງທີ່ເກັບໄວ້ໃນຖົ່ວໄຂຕ່າງໆ ກ່ອນອີ່ນໃຫ້ແຫຼງອາກາດໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງ ແລະ ຜ່າຕັດ. ແຍກຫົວ ແລະ ຫ້ອງອອກເພື່ອໄດ້ສ່ວນ ຮ່າງກາຍທີ່ມີລັກສະນະຮູບຮ່າງສຳຄັນສຳລັບການແຕ່ງສະໄລໃນແຜ່ນ ແກ້ວ ແລະ ການວິເຄາະ ຮູບຮ່າງເອິກ ສາມາດນຳໃຊ້ສຳລັບ MALDI-ToF ແລະ ຫ້ອງທີ່ເຫຼືອສາມາດເກັບຮັກສາສຳລັບການສະກັດ DNA. ສຳລັບການແມັບໂປຣຕິນ, ເອິກ ຖືກບິດ ດ້ວຍມືໃນຫຼອດ microtube 1.5 mL ດ້ວຍ homogenization solution 10 µL ໂດຍໃຊ້ pestle ແລະ pellet ທີ່ໃຊ້ຄັ້ງດຽວ. ປົກກະຕິໃຊ້ homogenization solution 2 ຊະນິດ: sterile distilled water ແລະ 25% formic

ເຈນ ແລະ ເຊື້ອຖືໄດ້. ດ້ວຍການສະໜອງຊັບພະຍາກອນທີ່ຄົບຖ້ວນນີ້, ພວກເຮົາມີຈຸດປະສົງເພື່ອຊ່ວຍນັກຄົ້ນຄວ້າໃນການເລືອກ ແລະ ນຳໃຊ້ເຕັກນິກການແຕ່ງສະໄລທີ່ເໝາະສົມທີ່ສຸດກັບຄວາມຕ້ອງການຂອງຕົນ.

ຄໍາຂອບໃຈ

ຜູ້ຂຽນຂອບໃຈທ່ານ Richard Lane ແລະ Zoe Jay Adams ຈາກ Natural History Museum ຂອງລອນດອນ (ສະຫະລາຊະອານາຈັກ) ສໍາລັບການອ່ານກວດຄົ້ນທີ່ດີເລີດ, ເຊິ່ງຊ່ວຍປັບປຸງຄຸນນະພາບຂອງເອກະສານນີ້.

ທຶນຄົ້ນຄ້ວາ

ພວກເຮົາຂອບໃຈອົງການພັດທະນາຂອງບາຊິນ CNPq (ເລກທີໂຄງການ: 404395/2024-4) ແລະ ມູນລະນິທິ Araucária (ເລກທີໂຄງການ: 433/2025 PDI) ສໍາລັບການສະໜັບສະໜູນທາງການເງິນໃນການຄົ້ນຄວ້າຂອງ AJA.

ຂໍ້ຂັດແຍງດ້ານຜົນປະໂຫຍດ (Conflicts of interest)

ທ່ານ Jérôme Depaquit ເປັນຮອງບັນນາທິການຂອງວາລະສານ Parasite; ລາວບໍ່ມີອິດທິພົນໃດໆຕໍ່ຂະບວນການປະເມີນຜົນ ຫຼື ການຕັດສິນໃຈກ່ຽວກັບການຕີພິມເອກະສານສະບັບນີ້. ຜູ້ຂຽນຄົນອື່ນໆແຈ້ງວ່າພວກເຂົາບໍ່ມີຄວາມຂັດແຍງທາງດ້ານຜົນປະໂຫຍດ.

ແຫຼ່ງຄວາມພ້ອມຂອງຂໍ້ມູນ

ວິດີໂອໃນເວັບໄຊ Zenodo:

ວິດີໂອ 1: <https://zenodo.org/records/18198006>

ວິດີໂອ 2: <https://zenodo.org/records/18311158>

ວິດີໂອ 3: <https://zenodo.org/records/18311106>

ວິດີໂອ 4: <https://zenodo.org/records/18311154>

ວິດີໂອ 5: <https://zenodo.org/records/18303014>

ວິດີໂອ 6: <https://zenodo.org/records/18302850>

ວິດີໂອ 7: <https://zenodo.org/records/18315029>

ເອກະສານເພີ່ມເຕີມ

ເອກະສານເພີ່ມເຕີມສໍາລັບບົດຕີພິມສະບັບນີ້ເບິ່ງໂດຍທີ່

[https://www.parasite-](https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2026009/olm)

[journal.org/10.1051/parasite/2026009/olm](https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2026009/olm)

ເອກະສານອ້າງອີງ

- 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, Ozbel 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, Aytakin 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.
- Castalaneli MA, Severtson DL, Brumley CJ, Szito A, Foottit 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.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Gidwani K, Picado A, Rijal S, Singh SP, Roy L, Volfova V, Andersen EW, Uranw S, Ostin 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, Ratnieri 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. Lestina 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, Pfluger 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, Mauras 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 proto-col 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 anthrooportunist? *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, Mekarnia N, Kerkoub H, Perveen FK, Huguenin A, Kariya E, Akhoundi M, De Andrade AJ, Berriatua E, Bongiorno G, Boyer S, Christodoulou V, Da Costa-Ribeiro MCV, De Souza LAF, Ding H, Dondji B, Dvořák V, Erisoz Kasap O, Galati EAB, Gállego M, Ballart C, Gouzelou S, Haddad N, Masse RS, Mekuria AH, Iovic 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>.



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>

ເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 1: ພື້ນຖານທາງເຄມີຊີວະທາດ (Biochemical theoretical foundations).

ແມງໄມ້ທີ່ກ່ຽວຂ້ອງໃນທີ່ນີ້ແມ່ນ ຮິ້ນຝ່ອຍຊາຍ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ແນວຄວາມຄິດທີ່ໄປສາມາດຂະຫຍາຍໄປເຖິງ ແມງໄມ້ຕົນຂໍ້ທີ່ໄປອື່ນໆ ທີ່ການຈຳແນກຊະນິດສາມາດດຳເນີນໄດ້ພຽງແຕ່ດ້ວຍລັກສະນະຮູບຮ່າງພາຍໃນ. ໂດຍບັງເອີນ, ອະໄວຍະວະພາຍໃນບາງຢ່າງມີໄຄຕິໄນສ່ວນ ແລະ ຮູບຮ່າງຂອງມັນໃຫ້ຂໍ້ມູນທີ່ມີຄຸນຄ່າແກ່ພວກເຮົາ. ນີ້ເປັນເຫດຜົນທີ່ຈະຕ້ອງໄດ້ສັງເກດເບິ່ງ ບໍ່ອາຫານ, ຖືກເກັບນໍ້າເຊື້ອ, ແລະ ທໍ່ຂອງມັນ. ດ້ວຍ reagents ທັງໝົດທີ່ພວກເຮົາຈະກວດຄົ້ນ, ຢູ່ລິມະວ່າຕັ້ງແຕ່ຂັ້ນຕອນການ fixation ຂອງແມງໄມ້ຈົນເຖິງການປະກອບຄືນ, ພວກເຮົາຈະນຳໃຊ້ປະຕິກິລິຍາ redox ງ່າຍໆເທົ່ານັ້ນ. ຂໍ້ລະມັດລະວັງ ຫຼື ແນວຄວາມຄິດ ແມ່ນການຫຼີກເວັ້ນການປະສົມສານຮີດີຊ (reducing reagents) ກັບ ສານອອກຊີໄດຊ (oxidizing reagents).

ເອທິລ ອາລຄອຣອລ; ເຫຼົ້າ ເອທານອນ

ສານນີ້ຈະນຳໃຊ້ໃນຫຼາຍຮູບແບບ. ໂມເລກຸນເຫຼົ້າມີການຈັບກັບນໍ້າສູງ ດັ່ງນັ້ນ ຈຶ່ງມີຜົນຕໍ່ການຕົງເອົານໍ້າອອກ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ເຫຼົ້າທີ່ມີຄວາມເຂັ້ມຕໍ່າ (ຄືມີນໍ້າຫຼາຍເກີນໄປ) ຈະມີບົດບາດຕໍ່ການເສື່ອມສະພາບສານກຳມະພັນ nucleic acid (ນໍ້າເປັນສັດຕູຂອງ nucleic acid).

ເມື່ອໃສ່ແມງໄມ້ໃນເຫຼົ້າເອທານອນ ບໍ່ພຽງແຕ່ເພື່ອຮັກສາແມງໄມ້ໄວ້ເທົ່ານັ້ນ, ແຕ່ຍັງເພື່ອຄົງສະພາບຂອງເນື້ອເຍື່ອ. ໃນດ້ານອະນາປັດ histology, ແມ່ນແຍກແນວຄວາມຄິດສຳຄັນເປັນສອງແນວ: ອັດຕາການຊຶມເຂົ້າໄປ (penetration rate) ແລະ ອັດຕາການຄົງສະພາບ (fixation rate). ເປັນເລື່ອງເຂົ້າໃຈດີວ່າ ສານເກັບຮັກສາທີ່ດີຕ້ອງຊຶມເຂົ້າໄປເຖິງເນື້ອເຍື່ອຢ່າງໄວວາກ່ອນການຄົງ

ສະພາບ. ສຳລັບເອທານອນ 96%, ຄ່າ penetration coefficient ປະມານ 1.05 (ປຽບທຽບກັບ 0.75% aqueous solution ຂອງ picric acid ມີ 0.45, ໃນຂະນະທີ່ 3% potassium dichromate solution ມີ 1.45).

ຄວາມຕ້ອງການຮັກສາແມງໄມ້ ແລະ ແມງໄມ້ຕົນຂໍ້ອື່ນໆໃນເອທານອນ ໄລຍະຍາວ

ແມ່ນຊີວິດຄວາມເປັນຈິງສຳລັບນັກຄົ້ນຄ້ວາແມງໄມ້ວິທະຍາ. ແນວຄວາມຄິດນີ້ຍັງມີຄວາມສຳຄັນໃນການເກັບ ການຈັບ ຈາກພາກສະໜາມເພື່ອການສຶກສາຂັ້ນຕໍ່ໄປ ຫຼື ສຳລັບນັກຄົ້ນຄ້ວາໃນອະນາຄົດ. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ແນວຄວາມຄິດນີ້ເປັນໄປບໍ່ໄດ້ສຳລັບ ນັກອະນາປັດ cytologist ຫຼື histologist. ເຊິ່ງການເກັບຕົວຢ່າງໃນສານຄົງສະພາບ fixative ດົນເກີນໄປ ອາດເຮັດໃຫ້ເຮັດວຽກຕໍ່ບໍ່ໄດ້. ນີ້ເປັນເຫດຜົນທີ່ຕົວຢ່າງອາຍຸເກີນ 10 ປີ ຈະນຳໃຊ້ຍາກ ຫຼື ການນຳໃຊ້ເປັນໄປບໍ່ໄດ້.

ອີກປັດໄຈໜຶ່ງຄືອັດຕາສ່ວນລະຫວ່າງມວນຂອງ ແມງໄມ້ຕົນຂໍ້ ທີ່ຕ້ອງຄົງສະພາບກັບປະລິມານສານຄົງສະພາບ (fixator). ໃນການປະຕິບັດທາງດານສັດ (zoological) ຫຼື ການແພດ, ແນະນຳໃຫ້ຄາດຄະເນ 60 ເທົ່າຂອງປະລິມານຕົວຢ່າງ. ໃນທາງປະຕິບັດ, ສຳລັບ ແມງໄມ້ນ້ອຍໆ, ສຳລັບປະລິມານຕົວຢ່າງທີ່ຕ້ອງກຳນົດ, ເພີ່ມ alcohol ອີກຢ່າງໜ້ອຍ 4-5 ປະລິມານ. ຈຶ່ງວ່າ alcohol ຈະສູນເສຍຄວາມເຂັ້ມເມື່ອດູດນໍ້າອອກຈາກເນື້ອເຍື່ອ ແມງໄມ້ຕົນຂໍ້.

ສະຫຼຸບ:

- Ethyl alcohol ເປັນ ສານຮີດີຊ (reducing reagents) (ດັ່ງນັ້ນບໍ່ເຂົ້າກັນກັບ ການຄົງສະພາບແບບອອກຊີໄດຊ);
- ເຮັດໃຫ້ໂປຣຕີນຕົກຕະກອນຢ່າງແຮງ ແລະ ເຮັດໃຫ້ພວກມັນເສື່ອມສະພາບ;
- ລະລາຍໄຂມັນປະສົມບາງຊະນິດ ແລະ ເຮັດໃຫ້ glycogen ຕົກຕະກອນ;
- ເຮັດໃຫ້ເກີດການຫົດຕົວຢ່າງແຮງຂອງເນື້ອເຍື່ອ ແລະ ເຮັດໃຫ້ພວກມັນແຂງຕົວ.

ສານລະລາຍຕ່າງ potassium hydroxide ຫຼື sodium hydroxide:

ການນຳໃຊ້ສານລະລາຍເຫຼົ່ານີ້ໃນສາຂາແມງໄມ້ວິທະຍາ(entomology) ແມ່ນໄດ້ເນັ້ນໃສ່ potassium hydroxide ເປັນຫຼັກໂດຍບໍ່ມີເຫດຜົນທີ່ຊັດເຈນ. Sodium hydroxide [E524] ມີຢູ່ໃນຮູບແບບສານລະລາຍ ໃນຄວາມເຂັ້ມຂຸນຫຼາຍລະດັບ ຫຼືຄ່າ normality ທີ່ແຕກຕ່າງ ແລະຍັງມີໃນຮູບແບບເມັດ ຫຼື ແຜ່ນນ້ອຍ. ຂໍ້ເສຍຫຼັກຂອງມັນຄືຄວາມຊື່ນສູງ (ສູງກ່ວາຂອງ KOH). ເມື່ອມັນປະຕິກິລິຍາກັບໂປຣຕິນ ມັນຈະລະລາຍໂປຣຕິນ ແລະເມື່ອກັບໄຂມັນ ມັນຈະປຸງເປັນສະບູແຂງໃນຂະບວນການ saponification (ນີ້ແມ່ນຄວາມແຕກຕ່າງສຳຄັນກັບ KOH ທີ່ໃຫ້ສະບູແບບເປັນທາດແຫຼວຈາກປະຕິກິລິຍານີ້).

Potassium hydroxide [E525]

ມີຢູ່ໃນຮູບແບບສານລະລາຍເຂັ້ມຂຸນ ແລະສ່ວນໃຫຍ່ໃນຮູບແບບເມັດປະມານ 0.1 g ເຊິ່ງຊ່ວຍໃຫ້ການກະກຽມສານລະລາຍເຈືອຈາງເຮັດໄດ້ງ່າຍ ເມື່ອບໍ່ມີຊີງສັງທີ່ແມ່ນຍຳ. ຕົວຢ່າງ ເມັດ 0.1 g ລະລາຍໃນນໍ້າກັ້ນ 1 mL ຈະໄດ້ສານລະລາຍ 10%. ຂໍ້ດີອື່ນຂອງ KOH ໃນຮູບແບບເມັດຄືມັນມີຄວາມໄວຕໍ່ການກໍ່ຕົວເປັນ carbonate ຫນ້ອຍກວ່າ (ເພາະສານລະລາຍ KOH ມີຄວາມສາມາດດຶງ CO₂ ສູງ ນຳໄປສູ່ການເກີດ carbonate).

ທາດຕ່າງສູງເຫຼົ່ານີ້ໃຊ້ເພື່ອລະລາຍກົດໄຂມັນ ໂດຍປຸງເປັນສະບູທີ່ລະລາຍໃນນໍ້າ. ຄວນນຶງວ່າສານຕຶງສະພາບ (fixateur) ເຊັ່ນ ethanol ກໍສາມາດລະລາຍໄຂມັນບາງສ່ວນໃນຕົວຢ່າງໄດ້ແລ້ວ. ແຕ່ເມື່ອນຳຕົວຢ່າງໄປຢູ່ໃນສະພາບນໍ້າທີ່ມີຕ່າງສູງ ກົດໄຂມັນ (ທີ່ມີຄວາມຊັບຊ້ອນຕ່າງກັນ) ຈະຕົກຕະກອນ. ຕ່າງສູງຈະເຮັດໃຫ້ເກີດ saponification ແບບເປັນ. ໃນບາງກໍລະນີ ເມື່ອມີໄຂມັນຫຼາຍ (ເຊັ່ນ ໃນໂຕແມ່) ອາດຈະມີປະໂຫຍດທີ່ຈະເພີ່ມອຸນຫະພູມເຖິງ 35–40 °C ເພື່ອຊ່ວຍໃຫ້ປະຕິກິລິຍາເກີດໄດ້ງ່າຍຂຶ້ນ ຫຼືເພີ່ມເວລາຂຶ້ນໃນອຸນຫະພູມເທື່ອ.

ສານລະລາຍ Marc-André ທີ່ຍ້ອມສີດ້ວຍ fuchsine ຫຼື ບໍ່ຍ້ອມສີ:

ໃນທີ່ນີ້ພວກເຮົາຈະກ່າວເຖິງຂໍ້ດີ ແລະ ຂໍ້ເສຍຂອງການນຳໃຊ້ສານລະລາຍ Marc-André. ສານນີ້ປະກອບມີ chloral hydrate (trichloroacétaldéhyde monohydraté), ກົດ acétique ແລະ ນໍ້າ. ມັນເປັນສານອອກຊີໄດຊ໌ແຮງ (ເປັນການປະສົມຂອງກົດ ແລະ aldehyde). ມັນສາມາດຊ່ວຍກຳຈັດ potassium hydroxide ທີ່ເຫຼືອຢູ່ໃນຕົວຢ່າງ ໂດຍບໍ່ເຮັດໃຫ້ສະບູຕ່າງທີ່ເກີດຈາກ KOH ຕົກຕະກອນ. ນອກຈາກນັ້ນ ສານອອກຊີໄດຊ໌ນີ້ຍັງມີຜົນຕໍ່ກຸ່ມເຫຼົ້າ alcohol ຂັ້ນສອງ (secondary alcohol) ຂອງ glucosamine ໃນ chitine ໂດຍການອອກຊີໄດຊ໌

ເຮັດໃຫ້ chitine ອ່ອນລົງ. ມັນຍັງສາມາດຊ່ວຍລະລາຍເກືອແຮູບາງຊະນິດໃນຕົວຢ່າງໄດ້.

ເມື່ອສານລະລາຍ Marc-André ຖືກຍ້ອມສີກ່ອນດ້ວຍ fuchsine acide (ຢູ່ໃນຮູບແບບທີ່ຖືກອອກຊີໄດຊ໌) ມັນສາມາດໄປຈັບກັບກຸ່ມ alcohol ຂັ້ນສອງໃນໂຄງສ້າງ chitine. ຫຼັງຈາກເວລາທີ່ໃຫ້ສານ Marc-André ສຳຜັດກັບຕົວຢ່າງ ແລະ ຂຶ້ນກັບລະດັບການຍ້ອມສີ ການລ້າງຈະເຮັດໂດຍໃຊ້ເຫຼົ້າ ethanol ເທົ່ານັ້ນ. ຫຼັງຈາກນັ້ນ ຈະເຂົ້າສູ່ຂັ້ນຕອນການດຶງນໍ້າອອກ (dehydration) ຈາກຕົວຢ່າງ.

ຂໍ້ດີ:

- ຊ່ວຍປັບສະພາບຕ່າງທີ່ເຫຼືອໃຫ້ເປັນກາງ
- ເຮັດໃຫ້ chitine ອ່ອນລົງ
- ຊ່ວຍຍ້ອມສີ chitine ເຮັດໃຫ້ເຫັນໂຄງສ້າງພາຍໃນທີ່ມີ chitine ຊັດເຈນຂຶ້ນ

ຂໍ້ເສຍ:

Chloral hydrate ເປັນສານທີ່ເປັນພິດເຮັດໃຫ້ຢາກນອນ ເຄີຍຖືກນຳໃຊ້ໃນທາງການແພດໃນຄົນ. ການນຳໃຊ້ຕ້ອງເຮັດໃນຕູດູດຄວັນ (hotte chimique) ແລະ ປະຕິບັດຕາມຂໍ້ກຳນົດຄວາມປອດໄພສານເຄມີຢ່າງເຄັ່ງຄັດ.

ສານລະລາຍສຳລັບການດຶງນໍ້າ (Dehydration):

ຈາກປະສົບການພົບວ່າ ສຳລັບຕົວຢ່າງທີ່ມີຂະໜາດນ້ອຍຫຼາຍ ບໍ່ຈຳເປັນຕ້ອງຜ່ານຂັ້ນຕອນແຊງເຫຼົ້າຫຼາຍລະດັບຄວາມເຂັ້ມຂຸນ. ຖ້າຕົວຢ່າງມີຂະໜາດໃຫຍ່ ຄວນເລີ່ມຈາກ ethanol 80% ຕາມດ້ວຍ 90%, 95% ແລະ ສຸດທ້າຍແມ່ນ ethanol ເຂັ້ມຂຸນ (absolute ethanol). ສຳລັບຕົວຢ່າງນ້ອຍຫຼາຍ ການແຊງໃນ 90% ແລະ ຕໍ່ດ້ວຍ absolute ethanol ກໍພຽງພໍ. ໃນຂັ້ນຕອນນີ້ ຄວນຄຳນຶງວ່າ absolute ethanol ມີແນວໂນ້ມດຶງນໍ້າຈາກອາກາດ.

ໃນອະດີດ ຫ້ອງວິເຄາະແມງໄມ້ວິທະຍາມັກໃຊ້ créosote ໃນຂັ້ນຕອນດຶງນໍ້າສຸດທ້າຍ. ປັດຈຸບັນ ສານນີ້ບໍ່ແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ແລ້ວ ເນື່ອງຈາກກິ່ນແຮງ (ກ່ຽວຂ້ອງກັບ polycyclic aromatic hydrocarbons) ແລະ ຄວາມເປັນພິດ: ອາດມີຜົນຕໍ່ລະບົບສືບພັນ, ກໍ່ໃຫ້ເກີດມະເຮັງ, ເປັນສານມົນລະພິດຕົກຄ້າງ ແລະ ມີຜົນຮ້າຍຕໍ່ສັດນໍ້າ.

ສານແນະນຳສຳລັບການແຕ່ງຕົວຢ່າງ ແມ່ນແນະນຳໃຫ້ໃຊ້ Euparal® ແລະ essence ຂອງ Euparal (ອະທິບາຍໃນພາກຕໍ່ໄປ). ການປະສົມ Euparal® ກັບ essence ຂອງມັນ ສາມາດໃຊ້ໄດ້ກັບຕົວຢ່າງທີ່ໄດ້ຜ່ານເຫຼົ້າ 90% ມາແລ້ວ.

ເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 2 : ສ່ວນປະກອບຂອງສານທີ່ໃຊ້.

Hydroxyde de potassium à 10 %

Hydroxyde de potassium : 10 g
ນ້ຳກ້ັນ: ເພີ່ມໃຫ້ຄົບ 100 mL

Milieu de montage gomme au chloral (milieu de Hoyer)

ນ້ຳກ້ັນ: 50 mL
Hydrate de chloral : 200 g
Gomme arabique : 50 g
Glycérol : 20 mL

ສານລະລາຍ Marc-André

Hydrate de chloral : 40 g
Acide acétique glacial : 30 mL
ນ້ຳກ້ັນ: 30 mL

Fuchsine acide à 1 % ໃນນ້ຳກ້ັນ

Fuchsine acide (poudre) : 1 g
ນ້ຳກ້ັນ: 99 mL

ສານລະລາຍ Marc-André ທີ່ຍ້ອມສີດ້ວຍ fuchsine

ສານລະລາຍ Marc-André : 10 mL
Fuchsine acide à 1% 50 µL

ເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 3 : Euparal®, baume du Canada, alcool polyvinylique ແລະ ສານນ້ຳຢາແຕງສະໄລອື່ນໆ

ເປັນນ້ຳຢາແຕງສະໄລທີ່ດີທີ່ສຸດເມື່ອບໍ່ມີຜະລິດຕະພັນທີ່ຈຳເປັນສຳລັບ dehydration ທີ່ເໝາະສົມ. Polyvinyl alcohol ຖືກປະສົມກັບ Amman's lactophenol. ເຖິງຢ່າງໃດກໍ່ຕາມ, ການປະຊຸມນີ້ມີຂໍ້ເສຍຫຼັກຄືການແຕງ ຫຼື polyvinyl alcohol ກາຍເປັນເຄສຕອນເນື່ອງຈາກການລະເຫີຍນ້ຳ ຫຼື ປຸງຽນສີດຳເມື່ອ phenol oxidize. ນີ້ຍັງເປັນເຕັກນິກສຳລັບການແຕງສະໄລຊົ່ວຄາວ.

Canada balsam: ການນຳໃຊ້ Canada balsam ສຳລັບ ແຕງສະໄລລະຫວ່າງ ແຜນແຖວສະໄລ ແລະ ແຜນປົກສະໄລ ຈຳເປັນຕ້ອງມີການດຶງນ້ຳອອກ (dehydration) ຈາກຕົວຢ່າງກ່ອນ. ການນຳໃຊ້ xylène ຫຼື toluène ໃນຂັ້ນຕອນນີ້ ກໍ່ມີຂໍ້ເສຍ ແລະ ຂໍ້ຈຳກັດບາງປະການ.

Enecé: ເຊັ່ນດຽວກັບສານນ້ຳຢາ Canada balsam, Enecé ຕ້ອງການໃຫ້ຕົວຢ່າງແຕງໂດຍການດຶງນ້ຳອອກກ່ອນ ກ່ອນທີ່ຈະແຕງໃສ່ແຜນສະໄລ. Enecé ປະກອບດ້ວຍ: rosin

ສີຂາວບໍລິສຸດ (22 ກຣາມ); copal gum ທີ່ລະລາຍໃນເຫຼົ້າ (12 ກຣາມ); ເຫຼົ້າບໍລິສຸດ (20 ມລ); camphor (10 ກຣາມ); turpentine (10 ມລ); eucalyptol: 26 ມລ. ການກະກຽມ: ໃນພາຊະນະທີ່ເໝາະສົມ (ເຊັ່ນ: ຂວດ Erlenmeyer), ປະສົມເຫຼົ້າບໍລິສຸດ ແລະ camphor, ຈາກນັ້ນຕື່ມ rosin ແລະ copal gum. ຫຼັງຈາກນັ້ນ, ປົດຝາກະຕຸກ ແລະ ສັ່ນ, ຈາກນັ້ນໃຫ້ຄວາມຮ້ອນໃນອ່າງນ້ຳທີ່ອຸ່ນຫະພູມປານກາງເພື່ອຫຼີກເວັ້ນການຕື່ມ. ເມື່ອເນື້ອໃນເປັນຂອງແຫຼວໝົດແລ້ວ, turpentine ຈະຖືກຕື່ມ. ຫຼັງຈາກນັ້ນ, ສ່ວນປະສົມຈະຖືກກັ່ນຕອງໃນຂະນະທີ່ຍັງອຸ່ນຢູ່, ແລະ eucalyptol ຈະຖືກຕື່ມໃສ່ນ້ຳກອງ. ເມື່ອສານປະສົມກາຍເປັນນ້ຳໜ້ອຍລົງ, ມັນຈະຖືກເຈືອຈາງດ້ວຍນ້ຳຢາ Enecé, ເຊິ່ງກະກຽມຕາມສູດຕໍ່ໄປນີ້: ເຫຼົ້າບໍລິສຸດ (30 ມລ), ກາຟີ (17 ກຣາມ), ນ້ຳຫອມນ້ຳມັນຢາງ (15 ມລ), ຢຸຄາລິບຕອລ (38 ມລ) (Cerqueira, 1943).

Euparal : ນີ້ເປັນຢາງ resin ທີ່ມາຈາກ Cypress ຂອງ Atlas Tetraclinis articulata (Vahl, 1791) ແລະ ຖືກສຶກສາ ແລະ ພັດທະນາໃນ 1906 ໂດຍ ທ່ານ Gilson. ຂໍ້ດີຫຼັກຄືມັນບໍ່ polymerize. ຕົວຢ່າງທີ່ແຕງສະໄລລະຫວ່າງ ແຜນແຖວສະໄລ ແລະ ແຜນປົກສາມາດເອົາອອກງ່າຍດ້ວຍການໃສ່ເຫຼົ້າ ຫຼື ດຶກວ່ານັ້ນ ແມ່ນໃຊ້ Euparal® essence. ຢາງ Resin ນີ້ ເອີ້ນ sandarac ສາມາດປະສົມກັບເຫຼົ້າໄດ້ ethanol ຈາກ 80%.

ການນຳໃຊ້ Triton X100: non-ionic aqueous solution:

Triton X100 ແມ່ນສານລະລາຍນ້ຳແບບບໍ່ມີປະຈຸ (non ionique) (4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol ຫຼື t-octylphenoxypolyethoxyethanol, polyethylene glycol tert-octylphenyl ether), ຖືກນຳໃຊ້ຢ່າງກວ້າງຂວາງເປັນສານຊັກຟອກໃນຊີວະວິທະຍາຂອງຈຸລັງ ແລະ ໂມເລກຸນ. ມັນຊ່ວຍໃຫ້ການຊຶມຜ່ານຂອງເຍື່ອຫູມຈຸລັງ ແລະ ເຍື່ອຫູມນິວເຄຼຍ. ຕົວຢ່າງແມງທີ່ເກັບໃນ ເຫຼົ້າເປັນເວລາຫຼາຍປີເປັນເລື່ອງທີ່ພົບເຫັນທົ່ວໄປ. ແຕ່ນຳເສຍດາຍ, ວິທີການຮັກສານີ້ຍັງບໍ່ດີທີ່ສຸດ, ແລະ ແມງໄມ້ ທີ່ຖືກຮັກສາໄວ້ໃນວິທີນີ້ມັກຈະເປັນເລື່ອງຍາກຫຼາຍທີ່ຈະກະກຽມສຳລັບການສັງເກດດ້ວຍກ້ອງຈຸລະທັດ. ພາຊະນະເກັບທີ່ເປັນຢ່າງທີ່ມີຕົວຢ່າງມັກເສື່ອມສະພາບ, ຕາມດ້ວຍການລະເຫີຍຂອງເຫຼົ້າ. ໃນທັງສອງກໍລະນີ, ການສຳຜັດກັບເຫຼົ້າເປັນເວລາດົນ ຫຼື ການແຕງຂອງຕົວຢ່າງເປັນບັນຫາໃຫຍ່. ໃນປີ 2008, ທ່ານ Jonque ໄດ້ເຜີຍແຜ່ບັນທຶກກ່ຽວກັບການເຮັດໃຫ້ນ້ຳເຂົ້າຄືນໃນແມງມຸມໂດຍໃຊ້ ສານເຮັດໃຫ້ຊຸມເຊັ່ນ Agepon, ເພື່ອໃຊ້ໃນການຖ່າຍຮູບ [26].

ການສັງເກດການນີ້ໄດ້ນຳໄປສູ່ແນວຄວາມຄິດຂອງການໃຊ້ສານເຮັດໃຫ້ຊຸມທີ່ບໍ່ແມ່ນຜົງຊັກຟອກທີ່ມີຄວາມເຂັ້ມຂຸນສູງ.

ຂັ້ນຕອນການໃຊ້ສານລະລາຍນ້ຳ 0.5% ຂອງ Triton X100:

- ແຊຕິວຢູງແຫຼງດ້ວຍເຫຼົ້າບໍລິສຸດ.
- ຕື່ມສານລະລາຍ 0.5% Triton X100 ໃນປະລິມານທີ່ຕ້ອງການ ເພື່ອໃຫ້ຕົວຢ່າງຈົມຢູ່ໃນນ້ຳໝົດ.
- ປະໄວປະມານ 5 ນາທີ ຫຼື ດົນກວ່ານັ້ນ. ແມງໄມ້ຕົ້ນຂໍ້ທັງໝົດຄວນຈະເປັນອິດສະຫຼະໃນສານລະລາຍ..
- ເອົາສານລະລາຍ Triton X100 ອອກ ແລະ ປຸງແທນດ້ວຍສານລະລາຍໄພແທດຊຽມໄຮດຣອກໄຊດ໌. ຫຼັງຈາກນັ້ນ, ສືບຕໍ່ໄປຕາມຕາມຂັ້ນຕອນທີ່ອະທິບາຍຂ້າງເທິງ.

ເອກະສານຊ້ອນທ້າຍ 4 : ຂັ້ນຕອນການແຕ່ງສະໄລດ້ວຍ Euparal® ຫຼື Canada Balsam

1. ຕົວຢ່າງຕ້ອງຖືກດຶງນ້ຳອອກໃຫ້ແຫຼງ (ລັກສະນະຂຸນ ຫຼື ຄ້າຍຄືນິມຊີ່ໃຫ້ເຫັນເຖິງການດຶງນ້ຳອອກທີ່ບໍ່ພຽງພໍ).
2. ການດຶງນ້ຳອອກສາມາດເຮັດໄດ້ໂດຍການເພີ່ມຄວາມເຂັ້ມຂຸນຂອງເຫຼົ້າ.
3. ຕົວຢ່າງສາມາດຍ້າຍອອກຈາກເຫຼົ້າ 99% ຫຼື ເຫຼົ້າບໍລິສຸດ (absolu) ໄປຫາສານທີ່ເຮັດໃຫ້ໃສ (agent d'éclaircissement) ໄດ້.

ຂັ້ນຕອນ (Procédure):

1. ນຳ ຮິ້ນຝອຍຊາຍ ຕົວແກ່ໃສ່ໃນພາຊະນະທີ່ມີເຫຼົ້າ ethanol 70%.
2. ດູດເອົາ ethanol ອອກ ແລະ ຕື່ມແທນດ້ວຍ KOH 10%. ປົກພາຊະນະທີ່ມີຕົວຢ່າງດ້ວຍ ແຜ່ນແກ້ວ.
3. ແຊປະໄວຈົນຕົວຢ່າງໃສ (transparent).
4. ດູດເອົາ KOH ອອກ.
5. ຕື່ມນ້ຳກັນ ແລະ ປຸງໄວ້ 30–45 ນາທີ.
6. ດູດເອົານ້ຳອອກ ແລະ ລ້າງຊ້ຳດ້ວຍນ້ຳກັນອີກ 30 ນາທີ (ເວລາຂຶ້ນກັບຈານວນຕົວຢ່າງ).
7. ດູດເອົານ້ຳອອກ.
8. ເພີ່ມສານນ້ຳຢາ Marc-André (ອາດຍ້ອມດ້ວຍ fuchsine) ແລະ ປະໄວ 24 ຊົ່ວໂມງ.
9. ດູດເອົາສານ Marc-André ອອກ.
10. ຕື່ມນ້ຳກັນ ແລະ ປະໄວ 30–45 ນາທີ.
11. ດູດເອົານ້ຳອອກ ແລະ ລ້າງຊ້ຳ 30 ນາທີ.
12. ດູດເອົານ້ຳອອກ.

13. ຕື່ມເຫຼົ້າ ethanol 70% ແລະ ຜ່າຕັດຕົວຢ່າງ:
 - a. ຫົວ ແລະ ທ້ອງ: ດຶງອອກຢ່າງລະມັດລະວັງໃຫ້ແຍກຈາກເອິກ;
 - b. ເອິກ: ຕັດປົກອອກ ໂດຍໃຊ້ເຂັ້ມຈັບ 2 ອັນ ຫຼື ຜ່າຕັດແບບກາງ (sagittal) ຕາມຄວາມຕ້ອງການ
14. ດຶງນ້ຳອອກແບບຄ່ອຍໆ ໃນຄວາມເຂັ້ມຂຸນຂອງເຫຼົ້າ ethanol ຈາກ 50 → 80 → 95% ແລະ ສຸດທ້າຍແມ່ນເຫຼົ້າເຂັ້ມຂຸນ absolute ethanol.
15. ດຶງນ້ຳອອກສຸດທ້າຍ ໂດຍແຊ ethanol 100% 2 ຄັ້ງ (10 ນາທີ/ຄັ້ງ).
16. ດູດເອົາ ethanol ອອກ ແລະ ປົກຕົວຢ່າງດ້ວຍ clove oil ເປັນເວລາ 15 ນາທີ ໃນອຸນຫະພູມຫ້ອງ.
17. ຍ້າຍຕົວຢ່າງໄປໃສ່ຢອດ Euparal® ຫຼື baume du Canada ຢູ່ເທິງ ແຜ່ນແກ້ວສະໄລ.
18. ຈັດຕຳແໜ່ງຕາມທີ່ຕ້ອງການ:
 - ແຍກຫົວ, ເອິກ, ແລະ ທ້ອງ ໂດຍໃຊ້ເຂັ້ມ ຫຼື ຄິມຄິບ ພາຍໃຕ້ກ້ອງຜ່າຕັດແມງໄມ້
 - ຫົວຄວນວາງໃນທ່າ ventro-dorsal ຄື occipital foramen ຕ້ອງຊື້ຂຶ້ນເທິງເພື່ອໃຫ້ cibarium ສາມາດສັງເກດໄດ້ໂດຍກົງ
 - ການຜ່າຕັດເຮັດໄດ້ໂດຍກົງ ໃນສານນ້ຳຢາແຕ່ງສະໄລ
19. ປຸງໃຫ້ແຫຼງຈົນເກີດຄວາມໜຽວໜ້ອຍໜຶ່ງ.
20. ຊຸບດ້ວຍເຫຼົ້າ absolute ethanol ແລະ ວາງທັບລົງໃນນ້ຳຢາ Euparal® ຫຼື baume du Canada ໂດຍຄ່ອຍໆໃຫ້ເປັນມຸມໜ້ອຍໆ.
21. ເກັບຮັກສາ ແຜ່ນແກ້ວສະໄລ ໃນກ່ອງແຫຼງທີ່ອອກແບບມາເພື່ອຈຸດປະສົງນີ້ສະເພາະ.