

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

TRẦN HẢI SƠN

**MUỖI CÁT (DIPTERA: PSYCHODIDAE) VÀ
THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS, LEISHMANIA
TẠI 6 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành : VI SINH VẬT HỌC

Mã số : 62 42 01 07

Hướng dẫn khoa học : TS. Trần Vũ Phong

PGS. TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng

Hà Nội, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Sau thời gian học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu, tôi đã hoàn thành chương trình học tập theo quy định cho nghiên cứu sinh và hoàn thành Luận án tiến sĩ với đề tài: “Muỗi cát (diptera: psychodidae) và thực trạng nhiễm Flavivirus, Leishmania tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam”.

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của TS. Trần Vũ Phong và PGS.TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng, với sự đồng ý của GS.TS. Vũ Sinh Nam - chủ nhiệm đề tài “*Sinh thái học các loài muỗi cát ở vùng sâu vùng xa miền Bắc Việt Nam và nguy cơ lây truyền Leishmania sang người*” được tài trợ bởi quỹ Nafosted, mã số 106-YS.05-2015.42. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình của tác giả nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm với những cam kết của mình cũng như nội dung luận án.

Hà nội, ngày tháng năm 2023
Người cam đoan

Trần Hải Sơn

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc, tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Vũ Sinh Nam - nguyên Phó Cục trưởng Cục Y tế dự phòng, Bộ Y tế, TS. Trần Vũ Phong - Trưởng khoa Côn trùng và Động vật Y học, PGS.TS Nguyễn Lê Khánh Hằng - Phó Trưởng khoa Vi rút, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương là những người Thầy/Cô đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, xây dựng đề cương, thu thập, phân tích số liệu, viết báo cáo và hoàn thiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Khoa Côn trùng và Động vật Y học, Khoa Virus, Trung tâm Đào tạo và Quản lý Khoa học - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã hỗ trợ, tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập triển khai nghiên cứu trên thực địa, trong phòng thí nghiệm và hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Lãnh đạo Sở Y tế, Lãnh đạo và cán bộ Trung tâm Kiểm soát bệnh tật thuộc 6 tỉnh: Lào Cai, Sơn La, Hà Giang, Lạng Sơn, Ninh Bình và Quảng Ninh đã hỗ trợ, giúp đỡ tôi trong quá trình tổ chức triển khai, thu thập số liệu, luôn tạo điều kiện tốt nhất trong suốt quá trình nghiên cứu, hoàn thiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Bộ Khoa học Công nghệ - Quỹ Nafosted đã hỗ trợ tài chính cho nghiên cứu này.

Tôi xin được tri ân những tình cảm vô bờ của bà, bố mẹ, vợ con tôi và các bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ và động viên tôi trong những ngày tháng học tập và nghiên cứu.

Hà nội, ngày tháng năm 2023

Nghiên cứu sinh

Trần Hải Sơn

MỤC LỤC

Lời cam đoan.....	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục.....	ii
Danh mục bảng	vii
Danh mục hình	viii
Danh mục một số từ viết tắt	x
Đặt vấn đề	1
Chương 1. Tổng quan tài liệu.....	3
1.1. Muỗi cát và một số đặc điểm dịch tễ	3
1.1.1. Bậc phân loại của muỗi cát	3
1.1.2. Sinh học, sinh thái và phân bố của muỗi cát.....	6
1.1.3. Các loài muỗi cát ở Việt Nam.....	10
1.1.4. Vai trò của muỗi cát trong việc truyền leishmania	11
1.1.5. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus của muỗi cát trong các nghiên cứu.....	14
1.2. Flavivirus và một số đặc điểm dịch tễ	17
1.2.1. Đặc điểm chung của virút nhóm flavivirus.....	17
1.2.2. Sự nhân lên của vi rút thuộc nhóm flavivirus	20
1.2.3. Đặc tính kháng nguyên (tham khảo thêm).....	21
1.2.4. Phương pháp chẩn đoán flavivirus trong phòng thí nghiệm.....	22
1.2.5. Bệnh do flavivirus lây truyền qua véc tơ đang lưu hành ở Việt Nam	24
1.3. Leishmania và một số đặc điểm dịch tễ	27
1.3.1. Bậc phân loại của leishmania.....	27
1.3.2. Ký sinh trùng leishmania và chu kỳ sống	28
1.3.3. Đặc điểm bộ gen của leishmania	30
1.3.4. Phương pháp chẩn đoán leishmania trong phòng thí nghiệm.....	37
1.3.5. Leishmaniasis và một số đặc điểm dịch tễ.....	42
1.3.6. Đặc điểm lâm sàng, điều trị và phòng ngừa.....	46
Chương 2. Phương pháp nghiên cứu.....	48

2.1.	Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1.....	49
2.1.1.	Địa điểm nghiên cứu	49
2.1.2.	Đối tượng nghiên cứu	49
2.1.3.	Thời gian thu mẫu	49
2.1.4.	Thiết kế nghiên cứu.....	49
2.1.5.	Cỡ mẫu	49
2.1.6.	Phương pháp thu thập muỗi cát tại các sinh cảnh khác nhau	49
2.1.7.	Phương pháp làm tiêu bản.....	51
2.1.8.	Phương pháp định loại muỗi.....	52
2.1.9.	Các chỉ số đầu ra trong nghiên cứu.....	52
2.1.10.	Nhập liệu và phân tích	52
2.2.	Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2.....	52
2.2.1.	Địa điểm nghiên cứu	52
2.2.2.	Đối tượng nghiên cứu	52
2.2.3.	Thiết kế nghiên cứu.....	52
2.2.4.	Cỡ mẫu.....	52
2.2.5.	Sinh phẩm và trang thiết bị	53
2.2.6.	Xác định/định danh flavivirus bằng kỹ thuật RT-PCR.....	54
2.2.7.	Giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger	57
2.2.8.	Nhập liệu và phân tích	58
2.3.	Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3.....	58
2.3.1.	Địa điểm nghiên cứu	59
2.3.2.	Đối tượng nghiên cứu	59
2.3.3.	Thiết kế nghiên cứu.....	59
2.3.4.	Cỡ mẫu	59
2.3.5.	Sinh phẩm và trang thiết bị	59
2.3.6.	Phản ứng Nested PCR.....	59
2.3.7.	Phương pháp giải trình tự gen NGS (Next generation sequencing)	60
2.3.8.	Phân tích bữa ăn máu	67
2.3.9.	Nhập liệu và phân tích	67

Chương 3. Kết quả nghiên cứu	68
3.1. Thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền bắc việt nam, 2016-2018.....	68
3.1.1. Thành phần loài muỗi cát theo giống, mật độ và độ phong phú.....	68
3.1.2. Phân bố muỗi cát theo tỉnh.....	71
3.1.3. Phân bố muỗi cát theo sinh cảnh đặt bẫy	75
3.1.4. Phân bố muỗi cát cái tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016.....	78
3.2. Thực trạng nhiễm flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.....	79
3.2.1. Sàng lọc flavivirus trên muỗi cát cái.....	79
3.2.2. Xác định flavivirus bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger	81
3.2.3. Một số đặc điểm flavivirus trên các loài muỗi cát cái	82
3.3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu	83
3.3.1. Sàng lọc Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR	83
3.3.2. Xác định Aeishmania bằng phương pháp giải trình tự gen NGS	85
3.3.3. Một số đặc điểm của leishmania trên quần thể muỗi cát	93
Chương 4. Bàn luận	94
4.1. Thành phần loài và một số đặc điểm sinh học sinh của muỗi cát tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016-2018	94
4.1.1. Định loài muỗi cát ở Việt Nam bằng các đặc điểm hình thái	94
4.1.2. Sinh học sinh thái và sinh cảnh của muỗi cát ở các tỉnh điều tra	102
4.2. Thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu	103
4.2.1. Xác định flavivirus trên muỗi cát	103
4.2.2. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus trên muỗi cát.....	105
4.2.3. Một số đặc điểm của Flavivirus trên các loài muỗi cát cái.....	106
4.3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu và nguy cơ lây truyền sang người.....	107
4.3.1. Leishmania xác định được tại Quảng Ninh	107
4.3.2. Leishmania xác định được tại Sơn La.....	110
4.3.3. Leishmania xác định được tại Ninh Bình	111
Kết luận	114

Khuyến nghị	116
Danh mục các bài báo đã công bố.....	117
Tài liệu tham khảo.....	118
Phụ lục	1
Phụ lục 01: Phiếu thu thập thông tin sinh cảnh đặt bẫy muối cát	1
Phụ lục 02: Hình ảnh chụp tiêu bản muối cát	117

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1.	Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán vi rút nhóm flavivirus	22
Bảng 1.2.	Bảng tổng hợp các phương pháp xác định và chẩn đoán leishmania	39
Bảng 3.1.	Số lượng, giới tính, mật độ và độ phong phú của muỗi cát theo loài tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016	69
Bảng 3.2.	Số lượng muỗi cát, độ phong phú, mật độ và số lượng loài theo tỉnh.....	73
Bảng 3.3.	Số lượng muỗi cát, độ phong phú, mật độ và số lượng loài theo sinh cảnh	76
Bảng 3.4.	Thông tin mẫu nghi nhiễm flavivirus trên quần thể muỗi cát	82
Bảng 3.5.	Mẫu nghi nhiễm leishmania bằng phương pháp Nested-PCR (n=20).....	85
Bảng 3.6.	Kết quả blast các trình tự thu được bằng phương pháp NGS lên cơ sở dữ liệu NCBI	86
Bảng 3.7.	Kết quả phân tích các mẫu có trình tự có sự tương đồng với leishmania bằng phương pháp NGS	87
Bảng 3.8.	So sánh các trình tự trong mẫu leishmania ở Ninh Bình - Vietnam/NB28062006.....	88
Bảng 3.9.	So sánh các trình tự trong mẫu leishmania ở Sơn La - Vietnam/SL210102016.....	89
Bảng 3.10.	Thông tin mẫu leishmania trên quần thể muỗi cát (n=3).....	93

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Bậc phân loại từ bộ tới phân giống của muỗi cát	6
Hình 1.2.	Hình thái các pha trong vòng đời của muỗi cát	7
Hình 1.3.	Các địa điểm xuất hiện muỗi cát tại miền bắc Việt Nam năm 1935	10
Hình 1.4.	Sự phát triển của leishmania trong đường tiêu hóa của muỗi cát	12
Hình 1.5.	Cây chủng loại phát sinh của nhóm flavivirus	14
Hình 1.6.	West Nile Virus Koutango lineage (PM148 sandfly MN057643.1) phân lập từ muỗi cát tại Niger, 2016	15
Hình 1.7.	Chủng flavivirus (MN090154 - Dreznica) phân lập từ muỗi cát tại Bosnia và Herzegovina, 2020	16
Hình 1.8.	Phân nhóm họ <i>Flaviviridae</i> trong cây phát sinh loài	17
Hình 1.9.	Mô hình cấu trúc gen của vi rút thuộc nhóm flavivirus	19
Hình 1.10.	Cấu trúc sợi đơn ARN của flavivirus	19
Hình 1.11.	Phân bố của các tıp huyết thanh Dengue lưu hành ở Việt Nam	25
Hình 1.12.	a. Leishmania trong đại thực bào, b: <i>Leishmanias infantum</i> trong đại thực bào bị phá huỷ, nhuộm Giemsa vết bôi tuỷ xương	28
Hình 1.13.	Bản đồ phân bố của 21 loài leishmania gây bệnh cho người	28
Hình 1.14.	Dạng promastigotes và amastigotes nhuộm Giemsa vật kính 100	29
Hình 1.15.	Vòng đời của <i>Leishmania infantum</i>	30
Hình 1.16.	Bản đồ di truyền gen rDNA (nằm trong nhiễm sắc thể số 27) với độ dài đoạn tương ứng ở các loài leishmania	32
Hình 1.17.	kDNA maxicircle, các gen thành phần và độ dài đoạn ở 5 loài leishmania: <i>L. major</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> và <i>L. tarentolae</i>	36
Hình 1.18.	kDNA minicircle của các loài leishmania và các mảnh thành phần của nó. CSB: Khối trình tự bảo tồn	37
Hình 1.19.	Leishmaniasis được tổng hợp tại Trung Quốc 2004-2010	44
Hình 1.20.	Leishmaniasis được tổng hợp tại Thái Lan 2004-2010	44
Hình 1.21.	Leishmaniasis được báo cáo tại Việt Nam	45
Hình 2.1.	Quy trình giải trình tự gen NGS với mẫu dương tính với nhóm leishmania61	
Hình 2.2.	Đo nồng độ DNA bằng Qubit	62

Hình 3.1.	Các điểm thu thập và thành phần loài muỗi cát ở 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016.....	72
Hình 3.2.	Sự phân bố muỗi cát cái tại 6 tỉnh nghiên cứu, 2016	79
Hình 3.3.	Kết quả RT-PCR sàng lọc flavivirus trên muỗi cát cái.....	80
Hình 3.4.	Tỷ lệ sàng lọc flavivirus trên muỗi cát cái	81
Hình 3.5.	Kết quả định loài flavivirus trên web https://www.rivm.nl	82
Hình 3.6.	Kết quả Nested-PCR sàng lọc leishmania trên muỗi cát cái	84
Hình 3.7.	Cây chủng loại phát sinh trên gen kDNA minicircle của mẫu thu thập tại Ninh Bình (Vietnam/NB28062006).	87
Hình 3.8.	Cây chủng loại phát sinh trên gen kDNA minicircle của mẫu thu thập tại Sơn La (Vietnam/SL210102016).	88
Hình 3.9.	Cây chủng loại phát sinh gen trên NST 27 của mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016).	90
Hình 3.10.	So sánh trình tự mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016) với chủng <i>L. donovani</i> CP022642.1	91
Hình 3.11.	So sánh trình tự mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016) với chủng <i>L. infantum</i> LR812960.1	92
Hình 4.1.	Khoá định loại vắn tắt bằng hình ảnh muỗi cát cái tại Việt Nam	95
Hình 4.2.	Hình ảnh phần đầu, bụng và phần phụ sinh dục của <i>Ph. yunshengensis</i> cái. ...	97
Hình 4.3.	Hình thái hàm của các con cái	100
Hình 4.4.	Các trình tự khuếch đại bằng mồi cFD2 và FS778 của flavivirus	104
Hình 4.5.	Sự phân bố địa lý của véc tơ muỗi cát trên thế giới theo các loài leishmania và ổ chứa động vật ở Cựu và Tân Thế giới	110

DANH MỤC MỘT SỐ TỪ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
1	AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrom	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải
2	ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
3	AVL	Anthroponotic visceral Leishmaniasis	Bệnh Leishmaniasis nội tạng nguồn lây từ con người
4	CAP	Capsid	Vỏ bọc
5	CHIKV	Chikungunya virus	Vi rút Chikungunya
6	CL	Cutaneous Leishmaniasis	Bệnh Leishmaniasis ở da
7	COI	Cytochrome oxidase subunit I	Tiểu đơn vị chính của phức hợp Cytochrome oxidase
8	CS	Cyclization Sequence	Trình tự tuần hoàn
9	DCS-PK	5'CS pseudoknot	Cấu trúc DCS-PK
10	DENV	Dengue virus	Vi rút Dengue
11	DHF	Dengue Hemorrhagic Fever	Sốt xuất huyết Dengue
12	DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
13	ETS	External transcribed spacer	Bộ đệm phiên mã ngoài
14	HCVNC		Hội chứng viêm não cấp
15	HIV	Human Immunodeficiency Virus	Vi rút gây suy giảm miễn dịch ở người
16	IGS	Immuno-chromatography technology	Kỹ thuật IGS
17	ITS	Internal transcribed spacer	Bộ đệm phiên mã trong
18	kDNA	DNA kinetoplast	DNA ty thể
19	MCL	Mucocutaneous Leishmaniasis	Bệnh Leishmaniasis niêm mạc và da

20	MLMT	Multilocus microsatellite typing	Kỹ thuật MLMT
21	MLST	Multilocus sequence typing	Kỹ thuật MLST
22	NTS	Nontranscribed spacer	Bộ đệm không phiên mã
23	OC-PCR	Oligochromatography-PCR	Kỹ thuật OC-PCR
24	PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi khuếch đại
25	PCR-RFLP	Restriction fragment length polymorphism – PCR	Kỹ thuật nghiên cứu tính đa hình chiều dài các đoạn giới hạn
26	PKDL	Post Kala azar Dermal Leishmaniasis	Bệnh Leishmaniasis nội tạng
27	rDNA	Ribosome DNA	ADN ribosome
28	rRNA	Ribosome RNA	ARN ribosome
29	SLA	Stem-loop A	Vòng kẹp tóc A
30	SLB	Stem-loop B	Vòng kẹp tóc B
31	SXHD		Sốt xuất huyết Dengue
32	TCYTTG		Tổ chức Y tế thế giới
33	UTR	Untranslated regions	Vùng không dịch mã
34	VL	Visceral Leishmaniasis	Bệnh Leishmaniasis nội tạng
35	VNNB		Viêm não Nhật Bản
36	VNVR		Viêm não vi rút
37	VR	Variable Regions	Vùng biến đổi
38	YFV	Yellow fever virus	Vi rút sốt vàng
39	ZIKV	Zika virus	Vi rút Zika

ĐẶT VẤN ĐỀ

Muỗi cát là những động vật chân đốt thuộc lớp côn trùng, bộ hai cánh, họ Psychodidae và phân họ Phlebotominae [16, 85]. Chúng hút máu người và động vật đồng thời truyền các tác nhân gây bệnh như vi rút và ký sinh trùng. Chúng từ lâu đã được biết đến với vai trò là các véc tơ truyền *Leishmania* và các tác nhân truyền bệnh khác cho con người và động vật.

Muỗi cát là véc tơ chính truyền bệnh Leishmaniasis, bệnh lưu hành ở hơn 98 quốc gia với 350 triệu người có nguy cơ mắc và trên 2 triệu ca bệnh mới hàng năm [117].

Vai trò truyền Flavivirus của muỗi cát còn chưa rõ ràng mặc dù đã có một số bằng chứng về Flavivirus hay ARN của Flavivirus có liên quan đến muỗi cát như vi rút Saboya được phân lập từ muỗi cát ở Senegal (1991-1992), hai trình tự Flavivirus đã được phát hiện ở muỗi cát *Phlebotomus perniciosus* ở Algeria (2007), Ecuador Paraiso Escondido virus - EPEV ở Ecuador (2011) hay vi rút West Nile tại Niger (2016). ARN Flavivirus cũng đã được phát hiện ở muỗi cát Phlebotomine từ Bồ Đào Nha [38, 45, 63, 71, 78].

Ở Việt Nam, muỗi cát lần đầu được ghi nhận vào năm 1935, và kể từ đó cho tới nay đã ghi nhận được 12 loài muỗi cát phân bố từ Bắc tới Nam [20, 24, 100]. Trong đó có loài *Ph. argentipes* là véc tơ truyền ký sinh trùng *Leishmania donovani* gây các bệnh Leishmaniasis thể nội tạng ở người như Anthroponotic Visceral Leishmaniasis (AVL) và Post Kala azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) [182]. Đồng thời với sự có mặt của véc tơ, các trường hợp bệnh liên quan đến ký sinh trùng *Leishmania* cũng xuất hiện ở Việt Nam [6, 12]. Gần đây nhất vào tháng 7/2018, bệnh viện Đa khoa Huế báo cáo một bệnh nhân ở Quảng Bình nhiễm *Leishmania*, đồng nhiễm HIV từ năm 2016. Bệnh nhân có các triệu chứng sốt cao, suy dinh dưỡng, khó chịu ở bụng, tiêu chảy, viêm phổi, gan và lách to sau khi được điều trị và đã hồi phục, hiện nay bệnh nhân vẫn khỏe mạnh [132].

Tại Việt Nam, việc giám sát các trường hợp bệnh Leishmaniasis chưa được thực hiện một cách hệ thống, số mắc được ghi nhận đơn lẻ tại các bệnh viện, thiếu các kỹ thuật cần thiết để xét nghiệm Leishmania. Trong báo cáo về ca bệnh ở Việt Nam, các tác nhân được xác định bằng phương pháp nhuộm Giemsa, một số khác được xác định định tính bằng phương pháp PCR, tuy nhiên các phương pháp này chưa đủ để xác định loài Leishmania gây bệnh. Các nghiên cứu về Leishmania và muỗi cát ở Việt Nam hiện nay chưa có sự tham gia của các nhà khoa học bản địa và các thông tin mới không được cập nhật kể từ thế kỷ 19. Trong khi các ca bệnh Leishmaniasis đang trở lại thành một trong các bệnh nhiệt đới mới nổi có thể gây thành dịch với gánh nặng về y tế, vì vậy Tổ chức Y tế thế giới đã kêu gọi các nước cần phải kiểm soát và ngăn chặn kịp thời [184].

Mặt khác, tại các tỉnh ghi nhận sự có mặt của muỗi cát thì các ca bệnh do véc tơ truyền với tác nhân là vi rút thuộc nhóm Flavivirus như viêm não Nhật bản (VNNB), sốt xuất huyết Dengue (SXHD) đang ngày càng gia tăng, điển hình ở các tỉnh miền núi phía Bắc, đặc biệt là Sơn La [4]. Trong năm 2014, tại tỉnh Sơn La ghi nhận vụ dịch viêm não vi rút (VNVR) quy mô lớn kéo dài từ tháng 6 đến tháng 9 với 164 ca mắc, trong đó 21 ca tử vong [9]. Các năm gần đây, khu vực miền núi như Hát Lót, Sơn La cũng liên tục ghi nhận các ổ dịch SXHD từ vài chục đến vài trăm trường hợp mắc [10]. Trong khi đó, một số nghiên cứu trên thế giới chỉ ra rằng có sự hiện diện của Flavivirus trong các con muỗi cát cái [33, 43, 71, 78].

Chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu "**Muỗi cát (diptera: psychodidae) và thực trạng nhiễm Flavivirus, Leishmania tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam**" với 3 mục tiêu:

- 1) Xác định thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016-2018.
- 2) Mô tả thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.
- 3) Mô tả thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. MUỖI CÁT VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ

1.1.1. Bậc phân loại của muỗi cát

Trong số hơn 800 loài muỗi cát đã được công nhận, khoảng 464 loài được tìm thấy ở Tân thế giới (New World) và 375 loài ở Cổ thế giới (Old World) [18, 155]. Việc sắp xếp bậc phân loại các loài muỗi cát ở cả Cổ và Tân thế giới trong giai đoạn trước thế kỷ 18 chủ yếu dựa trên xác định các đặc điểm cơ thể tương đồng giữa các bậc phân loại và phân bậc hơn là vì phân tích chủng loại phát sinh kiểu tổ tiên - hậu duệ. Cách tiếp cận này đã dẫn đến sự gia tăng các lớp phân loại, đặc biệt là ở các phân nhánh, nhưng lại đơn giản hóa và gộp các bậc phân loại cao hơn vào trong loài [29].

Xem xét các hệ thống phân loại thì với các bậc phân loại từ Họ trở lên thì muỗi cát được thống nhất sắp xếp vào:

- Ngành: Chân khớp (Arthropoda),
- Lớp: Côn trùng (Insecta),
- Bộ: Hai cánh (Diptera),
- Phân bộ Nematocera,
- Họ: Psychodidae,
- Phân họ: Phlebotominae (Bigot 1854, K.Kertész 1903) [16, 85].

Đối với các bậc phân loại dưới Họ thì có một vài quan điểm khác biệt, các quan điểm này khác nhau chủ yếu do phân chia vùng nghiên cứu trong các giai đoạn lịch sử và sau đó không có tên gọi thống nhất cho các bậc phân loại giống và loài. Ban đầu, các nghiên cứu về phân loại muỗi cát phân họ Phlebotominae chỉ dựa trên các khía cạnh hình thái của các mẫu vật. Tuy nhiên, gần đây với sự ra đời của một số phương pháp mới như phân tích nhiễm sắc thể, phép đo hình thái đa biến, nuôi và nhân dòng trong phòng thí nghiệm, isoenzyme, phân tích phân tử và phát sinh loài giúp các hiểu biết về muỗi cát đã tăng lên. Những tiến bộ này giúp việc xác định và phân loại muỗi cát tốt hơn và giúp làm rõ các đặc điểm khác biệt trong

các nhóm phân loại và trong quần thể muỗi cát. Một phần lớn tài liệu liên quan đến định loại muỗi cát đề cập đến sự phân loại chung và mối quan hệ của chúng với các nhóm khác [18, 98, 181, 187] cũng như phát sinh loài của họ Psychodidae, dựa trên hóa thạch côn trùng [74], sự tiến hóa của muỗi cát [98], phân tích chủng loại phát sinh loài của loài [144], hệ thống phân tử và mối quan hệ phát sinh loài sử dụng phân tích hệ gen [36]. Nhiều hệ thống phân loại cho muỗi cát đã được đề xuất kể từ thời Newstead 1911, bao gồm các hệ thống phân loại của Abonnenc, Davidson, Fairchild, Leng, Lewis, Quate và Theodor. Tuy nhiên, đến nay vẫn không có thống nhất chung nào liên quan đến việc xếp hạng các đơn vị phân loại cấp trên loài.

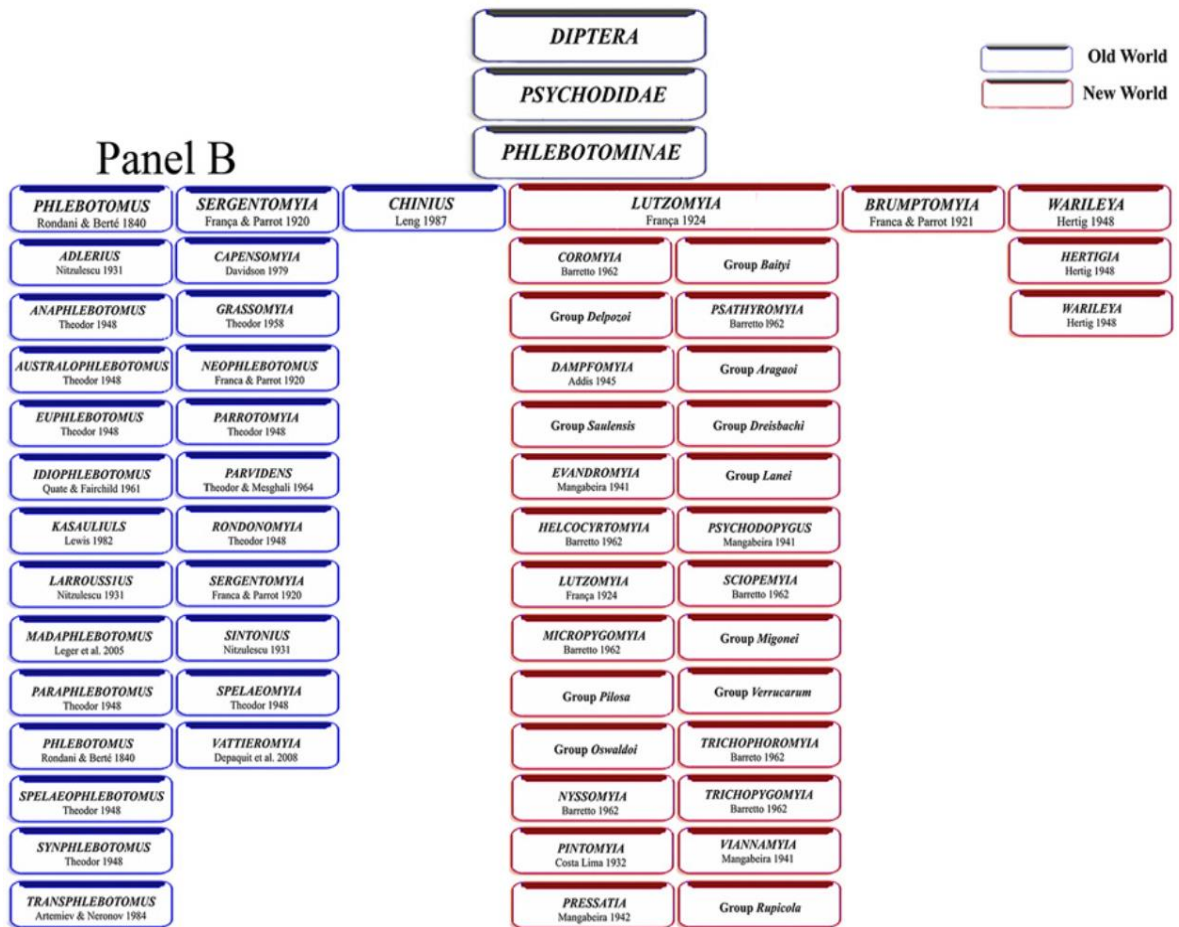
Lịch sử của phân loại muỗi cát có thể được chia thành hai thời kỳ riêng biệt. Trong thời kỳ đầu tiên, các đơn vị phân loại được phân biệt dựa trên việc phân tích các cấu trúc nhất định bên ngoài (cấu trúc của cơ quan sinh dục nam, các chỉ số gân cánh và các phép đo bên ngoài khác, được gọi là phlebotometry). Trong thời kỳ thứ hai, việc mô tả các cấu trúc bên trong như ống sinh tinh, hàm và yết hầu đã được sử dụng [131]. Dựa trên sự phân loại được thực hiện bởi Theodor [173], Lewis và cộng sự [102] đã đề xuất chia nhỏ phân họ muỗi cát Phlebotomine thành hai giống cho các loài Cổ thế giới là *Phlebotomus* (Rondani) và *Sergentomyia* (França), và ba giống cho các loài Tân thế giới là *Lutzomyia* (França), *Brumptomyia* (França và Parrot) và *Warileya* (Hertig). Giống *Chinius* (Leng, 1987) thuộc một đơn vị phân loại riêng biệt được sử dụng cho một số loài muỗi cát ở Trung Quốc [97]. Rispaill và Léger đã đề xuất một hệ thống phân giống và giống mới cho muỗi cát Cổ thế giới, dựa trên một nghiên cứu hình thái học cho thấy sự phân chia của chúng thành bảy giống, bao gồm *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaeophlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaeomyia*, và *Chinius* [144]. Ngoài phân loại đã đề cập, một số phân giống từ giống *Phlebotomus*, chẳng hạn như *Abonnencius* và *Legeromyia*, gần đây đã được mô tả và có thể được giữ lại cho đến khi một phân loại hoàn chỉnh được đề xuất cho toàn bộ giống *Phlebotomus*.

Một phân loại đầu tiên được đề xuất bởi Lewis và cộng sự, sau đó được Young và Duncan xem xét chia muỗi cát khu vực Neotropical (vùng sinh thái trên cận nhiệt đới của châu Mỹ và toàn bộ vùng ôn đới Nam Mỹ) thành *Lutzomyia* ,

Brumptomyia và Warileya [102, 187]. Cách phân loại này vẫn được đa số các nhà phân loại học về muỗi cát chấp nhận. Một hệ thống phân loại mới đã được đề xuất bởi Galati [18], sửa đổi cho muỗi cát ở Tân Thế Giới. Hệ thống đã công nhận 464 loài muỗi cát khu vực Neotropical thuộc phân họ Phlebotominae, được nhóm thành 23 giống, 20 phân giống, ba nhóm loài và 28 chi. Phân loại này bao gồm việc xem xét và tổ chức lại phân họ Phlebotominae, phân họ này được phân loại thêm thành hai tộc, Hertigiini (Hertigiina và Idiophlebotomina) và Phlebotomini (Phlebotomina, Australophlebotomina, Brumptomyiina, Sergentomyiina, Lutzomyiina).

Vào năm 2014, Galati đã sửa lại ấn phẩm trước đây của mình và đề xuất một phiên bản phân loại mới cho phân họ muỗi cát Phlebotominae [17, 18]. Dựa trên phân loại này, phân họ Phlebotomine bao gồm 931 loài trong đó 916 loài hợp lệ và 15 loài có tình trạng phân loại không chắc chắn.

Hiện tại, một cách tiếp cận thận trọng dựa trên các tiêu chí địa lý đã dẫn đến việc chia nhỏ phân họ Phlebotominae thành sáu giống: ba giống từ Cổ thế giới (Phlebotomus [13 phân giống], Sergentomyia [10 phân giống], và Chinius [4 loài]) và ba giống từ Tân thế giới (Lutzomyia [26 phân giống và nhóm], Brumptomyia [24 loài] và Warileya [6 loài])[94, 187]. Phân loại này hiện đang được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và trong tài liệu kiểm soát các Leishmania gây bệnh trên người và động vật do Tổ chức Y tế thế giới (TCYTTG) ban hành năm 2010 [182]. Với các hệ thống phân loại hiện nay thì có thể xem xét việc phân loại muỗi cát tại Việt Nam theo hệ thống 3 giống của Cổ thế giới (Phlebotomus, Sergentomyia, và Chinius). Việc sắp xếp các phân giống và loài ở Việt Nam còn phải dựa thành phần loài cụ thể tại địa bàn nghiên cứu (Hình 1.1).

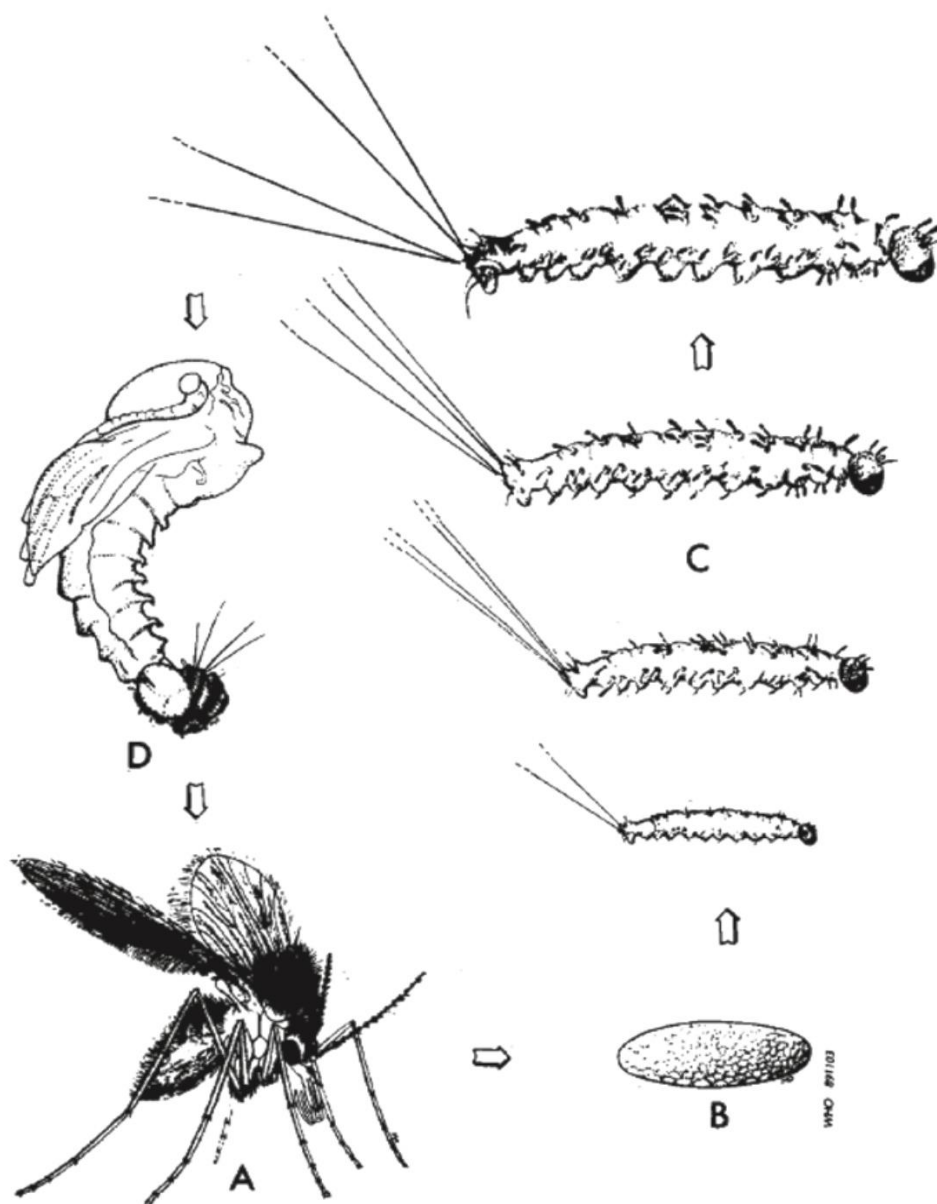


Hình 1.1. Bậc phân loại từ bộ tới phân giống của muỗi cát [29]

1.1.2. Sinh học, sinh thái và phân bố của muỗi cát

1.1.2.1. Sinh học, sinh thái

Muỗi cát trưởng thành có màu vàng nhạt, dài khoảng 2 - 4mm, mắt to và đen, lưng gù, mang 2 cánh dài và nhọn hình mác. Các cánh của muỗi cát không úp vào thân mà luôn dựng thẳng đứng, ngay cả khi ở tư thế nghỉ. Trên cánh và thân mình của muỗi cát có nhiều lông tơ, chân muỗi cát dài và mảnh, bộ phận sinh dục của con đực rất phát triển.



Hình 1.2. Hình thái các pha trong vòng đời của muỗi cát [182]

Muỗi cát là loài côn trùng vòng đời biến thái hoàn toàn. Trong chu kỳ phát triển có 4 pha riêng biệt: trứng, ấu trùng, nhộng và con trưởng thành. Trứng hình dài, ấu trùng có 12 đốt, đốt cuối có 2 lông dài (Hình 1.2).

Trứng của muỗi cát sau khi đẻ từ 4 -17 ngày sẽ nở thành ấu trùng. Ấu trùng sống trong đất tối ẩm ăn thực vật nát vụn, ấu trùng phát triển từ tuổi I đến tuổi IV trong khoảng 3 - 4 tuần hoặc có thể vài tháng phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường trước khi trở thành nhộng. Nhộng đóng ở tư thế dưỡn cong trên giá thể là vỏ lột của ấu trùng tuổi IV, sau 6 - 16 ngày nhộng trở thành muỗi cát trưởng thành.

Muỗi cát thường hoạt động về đêm, rất hiếm khi hoạt động ban ngày. Chỉ có muỗi cát cái hút máu và phần lớn là ưa hút máu động vật, tuy nhiên cũng có một số loài ưa thích hút máu người. Muỗi cát thường bay từng quầng ngắn là là mặt đất 30 - 40mm và bán kính hoạt động khoảng 1,5km. Trong khi đậu nghỉ muỗi cát thường ẩn ở những hốc tối, trong hang chuột, dưới những tảng đá lớn.

Nói chung, muỗi cát ưa khí hậu khô và nóng, nên ở những vùng có cát như sa mạc, ven biển dễ gặp muỗi cát. Một số loài muỗi cát thuộc giống *Phlebotomus* ưa thích sống trong hang động. Ở Việt Nam, muỗi cát khá phổ biến và có thể gặp ở nhiều sinh cảnh khác nhau.

1.1.2.2. Phân bố của muỗi cát trên thế giới

* Sự phân bố địa lý của các muỗi cát ở Cổ thế giới bao gồm 5 khu vực sau:

Vùng Palaearctic: giống *Phlebotomus* chiếm ưu thế ở vùng Palaearctic, vì đây là vùng ôn đới chính của Cổ thế giới. Gần 200 loài muỗi cát thuộc nhiều phân giống khác nhau trong giống *Phlebotomus*: *Adlerius*, *Anaphlebotomus*, *Euphlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Larrousius*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Synphlebotomus* và *Transphlebotomus*. Các giống *Chinius* và *Sergentomyia* cũng được thấy ở vùng Palaearctic bao gồm các nước Iran, Pakistan, Liên Xô cũ, Pháp, Thổ Nhĩ Kỳ, Maroc, Yemen, Tây Ban Nha, Tunisia, Afghanistan, Ả Rập Saudi, Iraq, Algeria, Ai Cập, Hy Lạp, Trung Quốc, Jordan [29].

Vùng Afrotropical: giống *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*, *Larrousius*, *Paraphlebotomus*, *Phlebotomus*, *Spelaophlebotomus* và *Synphlebotomus*) cùng với giống *Sergentomyia* được thấy ở vùng này. Tuy nhiên một số loài thuộc giống *Phlebotomus* này lại vắng mặt ở các khu vực phía tây (Gabon, Sudan, Cộng hòa Trung Phi, Ethiopia, Nam Phi) [29].

Vùng Malagasy (Madagascar và các đảo lân cận Ấn Độ Dương): Giống *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus* và *Madaphlebotomus*) và giống *Sergentomyia* hiện diện ở vùng này nhưng không có loài nào được báo cáo là véc tơ truyền bệnh ở trong khu vực [19].

Khu vực Châu Á: Khoảng 122 loài muỗi cát thuộc các giống *Phlebotomus*, *Chinius* và *Sergentomyia* có mặt ở khu vực này. Khí hậu khu vực này chủ yếu là khô hạn ở phía tây nên khu hệ muỗi cát về cơ bản là Eremian với khí hậu khô cần. Ở miền đông Ấn Độ, *Phlebotomus argentipes* là véc tơ truyền bệnh PKDL. Ở khu vực Đông Nam Á rất hiếm hoặc không có loài muỗi cát hút máu người, và dường như có khá ít loài ở khu vực này, ngoại trừ Philippines [95, 96, 100].

Khu vực Châu Úc: Muỗi cát Phlebotomine ở khu vực châu Úc có nguồn gốc lưỡng cực: ở phía nam có giống *Phlebotomus* (*Australophlebotomus* có 8 loài và *Idiophlebotomus* có 1 loài), ở phía bắc có giống *Sergentomyia* (24 loài) [101]. Cùng hiện của một số loài muỗi cát (*Se . hoogstraali*, *Se . vanella*) ở cả Australia và New Guinea ủng hộ giả thuyết bởi Schodde và Calaby liên quan đến sự phát triển đồng thời của khu hệ muỗi cát New Guinea cùng với loài muỗi cát phía đông Australia [151]. Những khu vực này, không giống như khu vực Eremian của bán cầu bắc, chỉ có một số loài *Phlebotomus*, và con người và gia súc hiếm khi bị tấn công [29].

*Muỗi cát ở Tân thế giới chỉ hiện diện trong 2 khu sinh thái Nearctic và Neotropical:

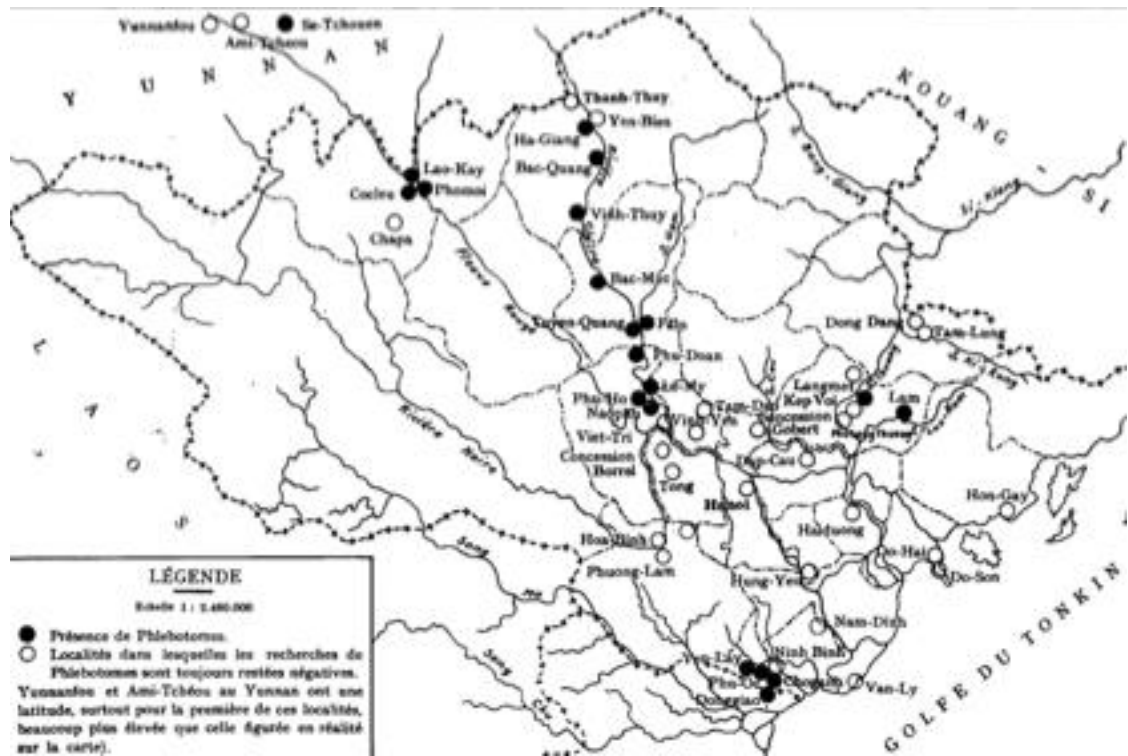
Vùng Nearctic (Bắc Mỹ): chỉ có 14 loài, phần lớn trong số đó đến từ phân giống *Micropygomyia* nhưng năm loài bị hạn chế trong vùng sinh thái này. Khí hậu ôn hòa ở Nearctic không thuận lợi cho sự phát triển của muỗi cát, đặc biệt là đối với các giai đoạn chưa trưởng thành. Đặc điểm này ủng hộ ý kiến cho rằng loài muỗi cát có thể có nguồn gốc từ vùng nhiệt đới, chỉ có một số loài phân tán đến các vùng ôn đới. Các loài muỗi cát hiện được tìm thấy ở Bắc Mỹ có thể phát sinh từ Palaearctic hoặc từ Nam Mỹ trong giai đoạn khô cần ở kỷ Đệ tam. Do đó, sự giảm hiện diện của chúng có thể là hậu quả của những biến động khí hậu liên tục xảy ra trong thời kỳ Đệ tứ, khiến nhiều loài muỗi cát bị tuyệt chủng hoặc di dời vào vùng nhiệt đới [18, 188, 189].

Vùng Neotropical (Nam Mỹ, Trung Mỹ và Caribe): có khoảng 450 loài muỗi cát được tìm thấy trong vùng sinh thái này. Trung tâm phân bố của giống *Lutzomyia* ngày nay trong Neotropics được cho là các vùng đất thấp có rừng ở phía đông dãy Andes. Tình trạng này có lẽ là hệ quả của các thời kỳ khô hạn xảy ra trong kỷ Pleistocen đã làm cô lập các quần thể đặc trưng, một số quần thể trong số đó trở

nên cô lập về mặt sinh sản và sinh sống ở các khu vực ẩm ướt hơn hiện diện ở phần phía bắc và phía tây của tiêu lục địa [144]. Số loài muỗi cát đa dạng hiện diện ở các khu vực ẩm ướt bao gồm nhiều loài muỗi cát hút máu người nhưng chỉ có một số loài ít loài trong đó là loài bản địa (Colombia, Ecuador, Costa Rica, Peru, Brazil, Guiana, Venezuela) [29].

1.1.3. Các loài muỗi cát ở Việt Nam

Phân bố của các loài muỗi cát ở Việt Nam được Raynal và công sự công bố vào năm 1935, cuộc khảo sát diễn ra ở miền Bắc và miền Trung của Việt Nam ghi nhận sự hiện diện của muỗi cát. 224 cá thể muỗi cát của 8 loài được thu thập: *Ph. stantoni*: 9; *Se. bailyi*: 196; *Se. barraudi*: 1; *Ph. sylvestris*: 3; *Se. hibernus*: 9; *Se. iyengari*: 3; *Se. morini*: 2; *Ph. argentipes*: 1 [22].



Hình 1.3. Các địa điểm xuất hiện muỗi cát tại miền bắc Việt Nam năm 1935 [22]

Khóa định loại muỗi cát của Lewis năm 1978 ghi nhận 10 loài muỗi cát tại Việt Nam, trong đó kiến nghị đổi tên loài *Ph. sylvestris* thành *Se (Neo) perturbans*. Trong khóa định loại này ông cũng sắp xếp các loài muỗi cát vào các giống và phân giống theo hệ thống định loại hình thái, cụ thể 10 loài muỗi cát của Việt Nam trong khóa định loại này là: *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni*, *Phlebotomus*

(*Euphlebotomus*) *argentipes*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *barraudi*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *brevicaulis*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *iyengari*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *perturbans*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *tonkinensis*, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *bailyi*, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *morini* [100].

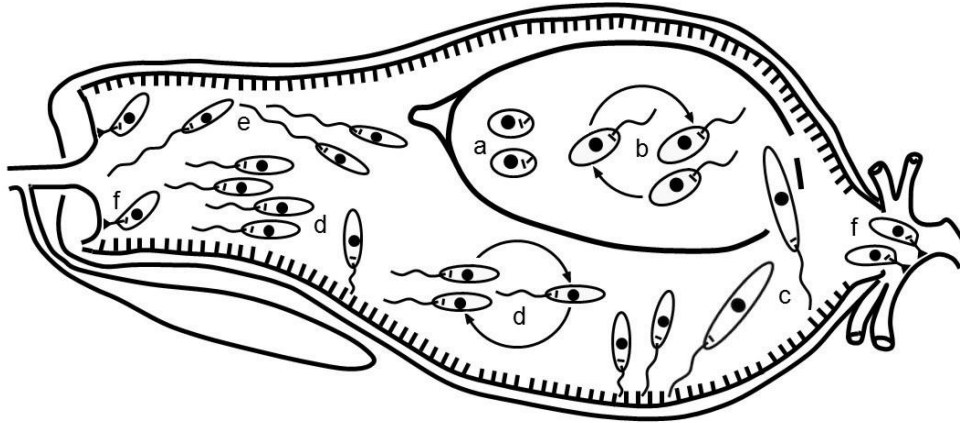
Một cuộc điều tra côn trùng bằng bẫy đèn của Thai Aurélie diễn ra từ 12/08/2002 đến ngày 02/09/2002 tại 4 địa điểm Cửa Lò (Nghệ An), Huế (Thừa Thiên Huế), Mũi Né (Bình Thuận) và Mỹ Thiên (Cần Thơ) ghi nhận 6 loài muỗi cát *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*) *stantoni*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *iyengari*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *bailyi*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *barraudi* và *Sergentomyia* (*Grassomyia*) *india* [24].

Như vậy tổng hợp các cuộc điều tra côn trùng từ năm 2004 trở về trước, ở Việt Nam ghi nhận tổng cộng 12 loài muỗi cát.

1.1.4. Vai trò của muỗi cát trong việc truyền Leishmania

Thuật ngữ "coevolution" lần đầu tiên được sử dụng để chứng minh kiểu quan hệ cụ thể giữa *Leishmania* và các loài muỗi cát ở Cổ thế giới [108]. *Leishmania* và muỗi cát đã tồn tại qua hàng triệu năm dưới áp lực chọn lọc tự nhiên của những thay đổi sinh thái. Mối quan hệ chặt chẽ đã được chứng minh giữa một số muỗi cát và loài *Leishmania* như *L. major* với *Ph. papatasi*. Lịch sử tiến hóa lâu đời này của *Leishmania* và muỗi cát đã dẫn đến việc chúng có chung một vùng phân bố. Tuy nhiên, không phải lúc nào cũng có sự phân biệt rõ ràng giữa coevolution và một số khái niệm khác, chẳng hạn như coassociation (nghĩa là chu trình lây truyền biểu hiện một dịch tễ học cảnh quan đặc biệt), tương tác (mối quan hệ phân tử và miễn dịch giữa muỗi cát và bề mặt bên ngoài của ký sinh trùng), hoặc véc tơ - ký sinh trùng hoặc đồng ký sinh [62]. Hầu hết ký sinh trùng đơn bào *Leishmania* phụ thuộc rất nhiều vào véc tơ muỗi cát có thể truyền chúng hơn là phạm vi vật chủ/ổ chứa của động vật có vú mà chúng có thể lây nhiễm, điều này cho thấy mối quan hệ gần gũi hơn với loài muỗi cát so với vật chủ là động vật có xương sống [141]. Ví dụ, có một mối quan hệ cụ thể giữa *Ph. papatasi* và *L. major* là do sự hiện diện của các thụ thể đặc hiệu ở ruột giữa [83], và hai loài này thể hiện sự giao cảm phân bố mạnh mẽ.

Tuy độ đặc hiệu cao của *Leishmania* đối với véc tơ muỗi cát của nó dường như bị hạn chế đối với *Ph. papatasi* hoặc *Ph. duboscqi* và *Ph. sergenti*. Tuy nhiên, sự xuất hiện của các giống lai giữa các loài *Leishmania* có thể làm thay đổi tính đặc hiệu và hiệu quả truyền tải [58, 179].



Hình 1.4. Sự phát triển của *Leishmania* trong đường tiêu hóa của muỗi cát [58].

Thụ thể đặc hiệu Midgut ở muỗi cát bao gồm một biểu mô lớp đơn với một đường viền dạng bàn chải của các vi nhung mao lót trong lòng. Ngược lại, phần trước (bao gồm van tá tràng) và phần sau (bao gồm cả tam giác môn vị) được lót bởi kitin. Amastigotes (a) bị ăn vào cùng với máu vào bụng giữa biến đổi thành promastigotes procyclic (b), chúng sao chép và biến đổi thành nectomonads dài (c). Trong quá trình tiêu hóa máu, các ký sinh trùng được bao quanh bởi chất nền peritrophic (PM). Khi PM bị phá vỡ bởi các enzym của muỗi cát, các nectomonads dài thoát ra ngoài qua lỗ sau và gắn vào các vi nhung mao ở giữa. Giai đoạn tiếp theo là các nectomonads ngắn nhân lên được gọi là leptomonads (d); chúng biến đổi thành các chất xúc tiến siêu vòng (e) thâm nhiễm hoặc gắn vào lớp màng kitin của van tá tràng dưới dạng haptomonads (f). Trong giai đoạn phát triển muộn, khối lượng nectomonads tiết ra proteophosphoglycan dạng sợi gây tắc nghẽn đường giữa lòng ngực. Điều này, cùng với việc phá hủy van, làm dễ dàng sự trào ngược của ký sinh trùng khi muỗi cát hút máu tiếp theo. Ở phân giống viannia và sauro

Leishmania, các haptomonad cũng gắn vào lớp lót kitin của vùng môn vị (hình 1.4).

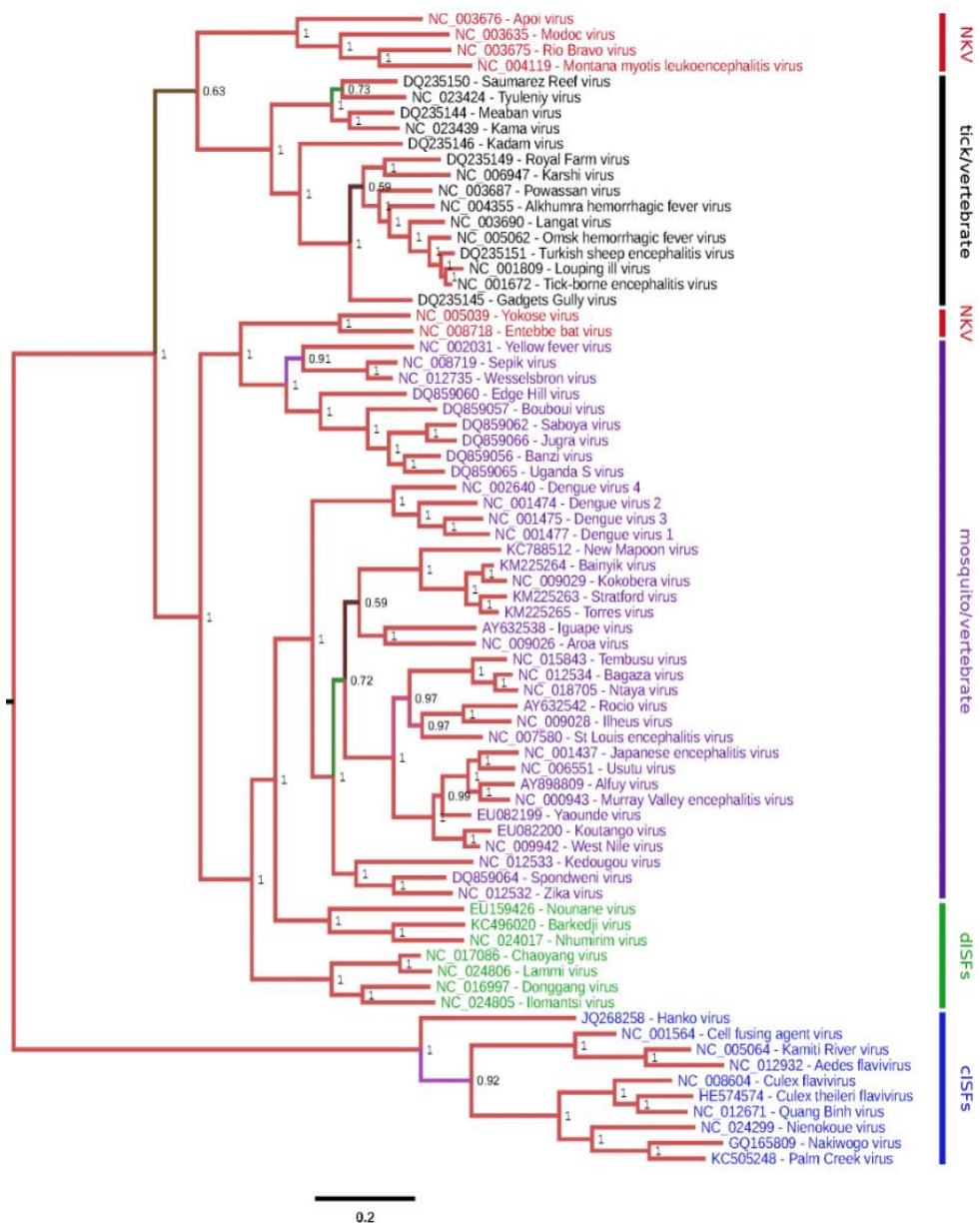
Muỗi cát là véc tơ truyền Leishmania đã được chứng minh. Năm tiêu chí do Killick-Kendrick nêu ra được yêu cầu để xác định một loài muỗi cát cụ thể là véc tơ bao gồm:

- Có những dữ liệu dịch tễ học về bệnh tương ứng
- Có hành vi ăn máu của loài muỗi cát trên vật chủ trung gian là động vật,
- Phân lập được các ký sinh trùng dạng promastigote từ muỗi cát
- Có vòng đời hoàn chỉnh của ký sinh trùng trên véc tơ giả định của nó
- Có sự lây truyền ký sinh trùng qua vết cắn của loài bị nhiễm bệnh [88].

Kể từ những năm 1990, với việc phát minh ra kỹ thuật PCR và những tiến bộ trong sinh học phân tử, bằng chứng phân tử đã được thêm vào các tiêu chí đã đề cập và các báo cáo liên quan đến sự hiện diện ADN của Leishmania ở các loài muỗi cát khác nhau đã tăng lên đáng kể. Tuy nhiên, theo các tiêu chí đã đề cập ở trên, sự hiện diện của ADN Leishmania trong loài muỗi cát chắc chắn không được coi là tiêu chí đủ để xác định loài muỗi cát là vật trung gian đã được chứng minh. Các bằng chứng khác làm nổi bật sự hiện diện của các kDNA siêu vòng trong ruột của côn trùng cũng như chứng minh khả năng truyền lại Leishmania của côn trùng là những tiêu chí cần thiết cần được nghiên cứu để chỉ ra năng lực véc tơ của muỗi cát cái. Khoảng 166 loài được báo cáo là vật trung gian đã được chứng minh hoặc tiềm năng của các loài Leishmania khác nhau ở Tân thế giới và Cổ thế giới. Trong số các loài này, 78 loài đã được chứng minh là véc tơ của của Leishmania. Trong Cổ thế giới, Leishmania được truyền bởi loài muỗi cát thuộc giống Phlebotomus (49 loài, 31 loài được báo cáo là đã được chứng minh), trong khi Sauro Leishmania được truyền bởi loài muỗi cát thuộc giống Sergentomyia. Ở Tân thế giới, các loài Leishmania, Viannia và Endotrypanum được truyền bởi loài muỗi cát thuộc giống Lutzomyia (118 loài, 47 loài được báo cáo là đã được chứng minh). Trong số các vectơ muỗi cát nêu trên, 7 loài tham gia vào việc truyền tải *L. major*, 7 loài truyền *L. tropica*, 31 loài truyền *L. infantum*, và 9 loài truyền *L. donovani* [29].

1.1.5. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus của muỗi cát trong các nghiên cứu

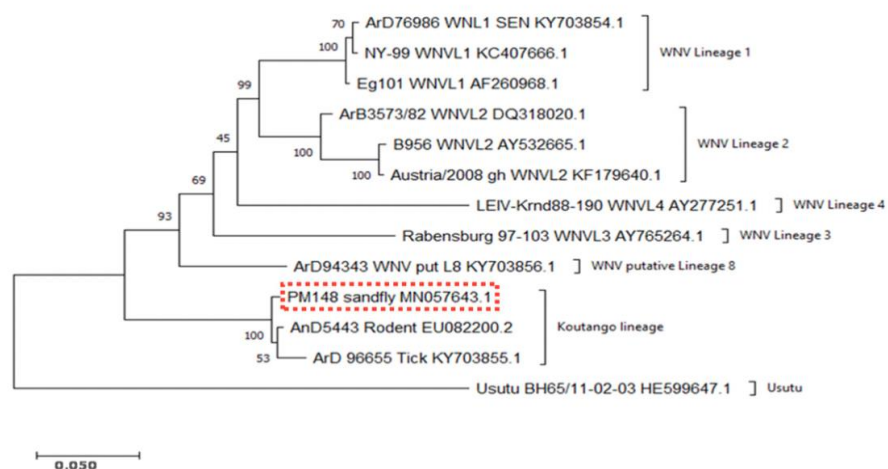
Trên cơ sở các nghiên cứu về trung hoà vi rút, các thông tin về véc tơ nhóm chân đốt – động vật có xương sống, Flavivirus được chia thành 4 nhóm chính: Flavivirus do ve/bọ truyền/động vật có xương sống (tick-borne flaviviruses-TBFVs), Flavivirus do muỗi/động vật có xương sống truyền (mosquito-borne flaviviruses -MBFVs), Flavivirus không xác định được vector (no- known-vector flaviviruses - NKVs) và Flavivirus gây bệnh trên người được truyền qua côn trùng (InsectSpecific flaviviruses - ISFs) (Hình 1.5).



Hình 1.5. Cây chủng loại phát sinh của nhóm Flavivirus [43]

Theo Bradley J. Blitvich (2015), trong nghiên cứu tổng hợp về Flavivirus gây bệnh trên người được truyền qua côn trùng (ISFs), đã cho thấy có sự gia tăng đáng kể về số lượng các ISFs trong thời gian gần đây [43]. Trước đây, Flavivirus trên côn trùng ít được quan tâm do không có khả năng lây nhiễm sang các tế bào động vật có xương sống. Quan điểm này đã thay đổi trong những năm gần đây vì một số ISFs đã được chứng minh là tăng cường hoặc ngăn chặn sự sao chép của các Flavivirus trong các tế bào muỗi đồng nhiễm. ISFs được chia thành 2 nhóm phát sinh loài riêng biệt là dIFs và cIFs. Nhóm cIFs có *Culex Flavivirus*, *Aedes Flavivirus*, *Quang Binh virus*.....khác biệt về mặt phát sinh loài với các Flavivirus đã biết (Hình 1.5). Vi rút Quảng Bình ghi nhận ở trên muỗi *Culex tritaeniorhynchus* thu thập năm 2002 tại Quảng Bình (Phan Thị Ngà và cộng sự - 2009) [43, 51].

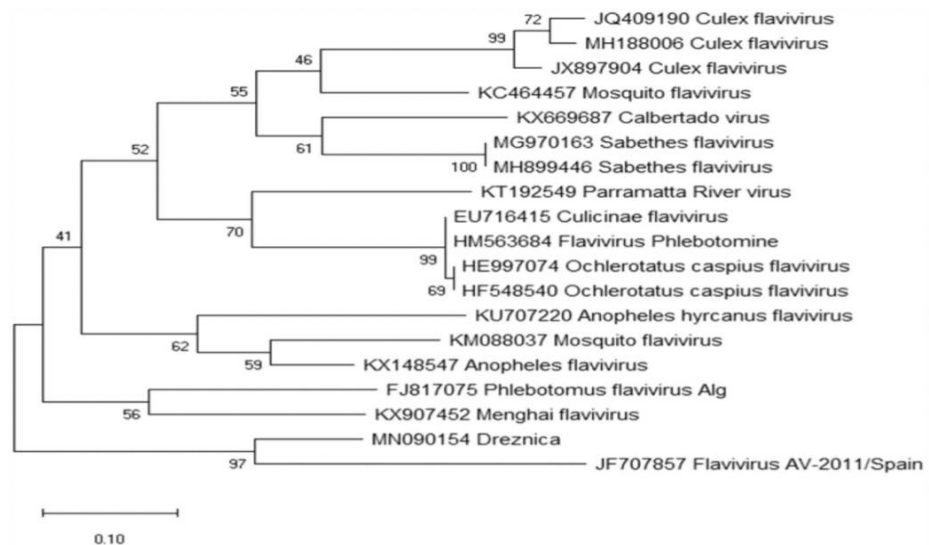
Nghiên cứu tại Niger-Châu Phi (2021) khi thu thập muỗi cát năm 2016 đã xác định được 1 pool dương tính/100 pool thực hiện (10.816 muỗi cát). Vi rút West Nile thuộc Koutango lineage (PM148 sandfly MN057643.1) được xác định bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang (IFA) và Realtime RT-PCR (Hình 1.6) [63, 191]. Một nghiên cứu khác của D.Fontenille (1994), 4 chủng vi rút Saboya (Saboya virus) thuộc Flavivirus, ở Senegal-Tây Phi năm 1991-1992 cũng được phát hiện ở muỗi cát phân họ Phlebotomine [78]. Vi rút Saboya ban đầu được phân lập từ loài chuột nhảy *Tatemyia itempi* ở làng Saboya ở Senegal và sau đó được xác định ở loài gặm nhấm *Mastomys*, *Avicantia nilaticus* và *Mus musculus* và chiropters ở Cộng hòa Guinea. Nó cũng được phân lập từ muỗi giống *Anopheles* và bọ ve.



Hình 1.6. West Nile Virus Koutango lineage (PM148 sandfly MN057643.1) phân lập từ muỗi cát tại Niger, 2016 [63]

Công bố của C. Alkan và cộng sự năm 2015 tìm thấy 1 chủng Falvivirus đã được phân lập từ pool 30 con muỗi cát cái của loài *Ph. abonnenci* tại Ecuador, là 1 falvivirus mới được đặt tên là Ecuador Paraiso Escondido Virus (EPEV). Trong nghiên cứu này, cỡ mẫu của nghiên cứu là n=1150 và trong hơn 10 năm nghiên cứu tại Châu Âu, Châu Phi và Trung Đông, tác giả đã sàng lọc trên hàng ngàn con muỗi cát thuộc 2 giống *Phlebotomus* và *Sergentomyia* nhưng đến năm 2015 là lần đầu tiên tác giả phân lập được Flavivirus trên muỗi cát [33].

Một nghiên cứu khác của Gregory Moureau năm 2010 cũng công bố phát hiện ARN của Flavivirus trên muỗi cát. Trong nghiên cứu này, 1508 muỗi cát thu thập ở Pháp và Algeria, từ tháng 8 năm 2006 đến tháng 7 năm 2007, 2 pool con đực trong số 67 pool của loài *Phlebotomus perniciosus* này ở Algeria đã dương tính với Flavivirus. Hai trình tự kết quả có liên quan chặt chẽ với các Flavivirus liên quan đến côn trùng truyền của giống *Culex*. Đây là mô tả đầu tiên về các Flavivirus chỉ dành cho côn trùng thuộc họ Culicidae (bao gồm các giống *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Anopheles*), được tìm thấy trên muỗi cát thuộc họ Psychodidae.



Hình 1.7. Chủng Flavivirus (MN090154 - Dreznica) phân lập từ muỗi cát tại Bosnia và Herzegovina, 2020 [78]

Nghiên cứu của Mirsada Hukić năm 2020 phát hiện 1 chủng Flavivirus mới ở muỗi cát ở Bosnia và Herzegovina. Phương pháp sàng lọc của nghiên cứu này sử dụng cặp môi Pan-Flavivirus (MAMD/cFD2) trong phản ứng RT-PCR để sàng lọc

Flavivirus trên các loài muỗi cát thuộc giống *Phlebotomus*, kết quả của nghiên cứu này thể hiện trong hình 1.7 [78]. Cặp môi này được thiết kế trên gen NS5 cho phép khuếch đại 51 loài Flavivirus [118].

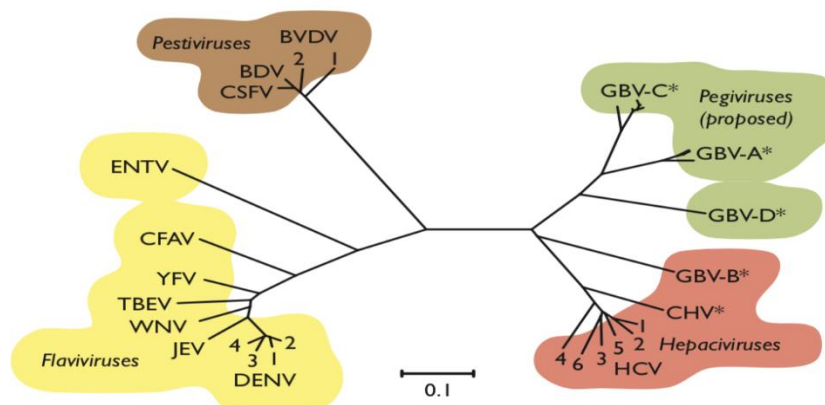
Như vậy cho đến nay, mặc dù đã xác định được một số Flavivirus hay ARN Flavivirus có liên quan đến muỗi cát, nhưng số liệu còn rất hạn chế. Vi rút Saboya được phân lập từ muỗi cát ở Senegal (1991-1992), hai trình tự Flavivirus đã được phát hiện ở loài muỗi cát *Phlebotomus perniciosus* ở Algeria (2007), EPEV ở Ecuador (2011) hay vi rút West Nile tại Niger (2016). ARN Flavivirus cũng đã được phát hiện ở muỗi cát phân họ Phlebotomine từ Bồ Đào Nha. Chúng tạo thành một nhóm đơn ngành có liên quan chặt chẽ hơn với các Flavivirus chỉ có ở muỗi cát.

1.2. FLAVIVIRUS VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ

1.2.1. Đặc điểm chung của virút nhóm Flavivirus

1.2.1.1. Phân loại

Họ *Flaviviridae* bao gồm có 4 chi: *Flavivirus*, *Hepacivirus*, *Pestivirus* và *Pegivirus*. Trong đó, chi *Flavivirus* trong tiếng Latin, “flavus” có nghĩa là “màu vàng” bởi vàng da gây bởi vi rút sốt vàng, chi này có hơn 53 thành viên trong đó có các bệnh do véc tơ truyền do vi rút Dengue gây sốt Dengue, sốt xuất huyết Dengue, hội chứng shock Dengue; vi rút gây viêm não Nhật Bản; vi rút sốt vàng gây bệnh sốt vàng da; vi rút Chikungunya, Kyasanur Forest disease, Murray Valley encephalitis, Omsk hemorrhagic fever, tick-borne encephalitis, West Nile fever, và Zika.



Hình 1.8. Phân nhóm họ *Flaviviridae* trong cây phát sinh loài

(Nguồn: David M.Kniper and Peter M.Howley, *Field Virology*, 6th edition, 2013

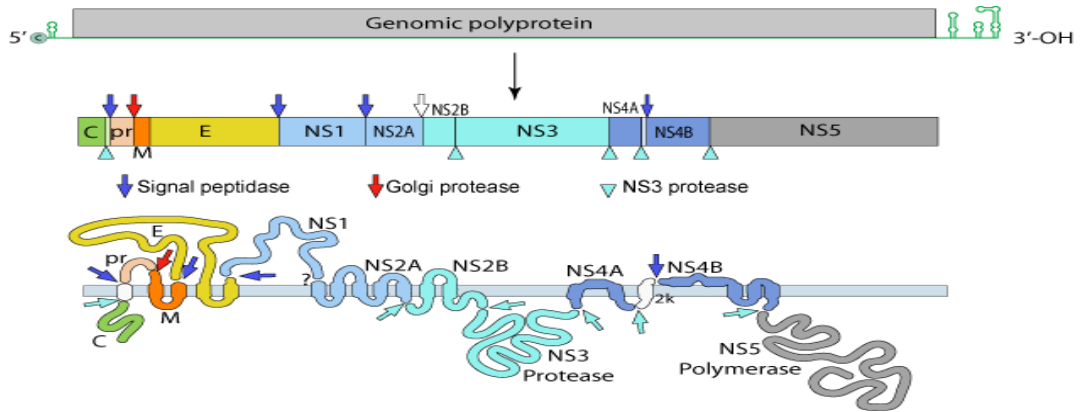
<https://basicmedicalkey.com/flaviviridae/#F1-25>)

Vi rút Dengue là thành viên của chi *Flavivirus*, thuộc nhóm vi rút gây bệnh thông qua động vật chân khớp (vector arthropode-born) bao gồm 4 típ huyết thanh chính (DEN-1, DEN-2, DEN-3 và DEN-4) trên cơ sở tương tác khác nhau với kháng thể trong huyết thanh người. Các típ huyết thanh có sự khác biệt về axit amin tại protein vỏ (E) từ 25% đến 40%, và trong mỗi típ huyết thanh cũng có sự đa dạng về di truyền. Tuy có những sự khác biệt về di truyền như vậy, nhưng cơ chế gây bệnh và biểu hiện lâm sàng của người bệnh khi nhiễm các típ huyết thanh khác nhau là tương tự.

Vi rút DEN-5 gây bệnh lúc đầu được cho là DEN-4 động vật, vi rút này lưu hành trên loài linh trưởng và muỗi *Aedes nivalis* trong các rừng ở Tây nam châu Á, tuy nhiên, khi phân tích toàn bộ hệ gen đã cho thấy vi rút có sự khác biệt về di truyền với 3 kiểu vi rút DEN-4 lưu hành trên động vật đã biết và có một số điểm tương tự DEN-2. Hiện tại, chưa có thêm thông tin về DEN-5 và điều tra hồi cứu tại vụ dịch Sarawak năm 2007 cho thấy chỉ duy nhất 1 bệnh nhân nhập viện điều trị và được khẳng định là DEN-5, các bệnh nhân khác điều trị ngoại trú, có thể giả thuyết về khả năng gây bệnh nhẹ của vi rút DEN-5 và cũng là nguyên nhân chưa có nhiều thông tin về vi rút này.

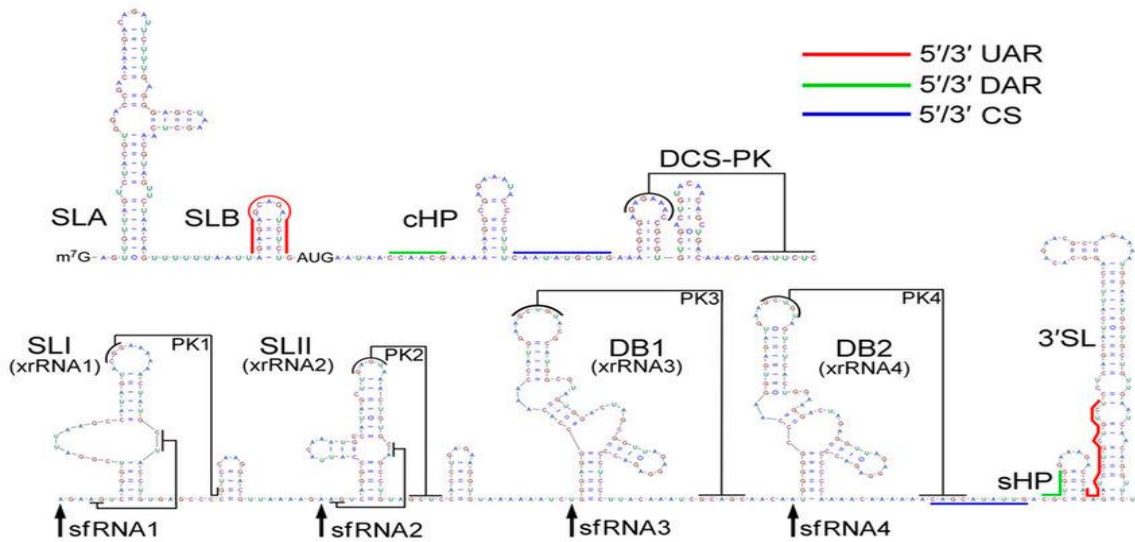
1.2.1.2. Đặc điểm hình thái và cấu trúc vật liệu di truyền nhóm Flavivirus

Flavivirus có chung cấu trúc hạt, trong đó DENV và ZIKV được mô tả điển hình nhất. Genome DENV có dạng hình cầu có đường kính 50 nm [91]. Bên trong lõi của vi rút là nucleocapsid là cấu trúc của hệ gen vi rút cùng protein C. Nucleocapsid được bao quanh bởi màng (vỏ vi rút) là lớp lipid kép, chứa glycoprotein và protein có nguồn gốc từ màng sinh chất của tế bào. Chồi lên trên vỏ vi rút là 180 bản sao của protein M và E tạo thành những gai trên bề mặt. Những protein này tạo thành một lớp bảo vệ bên ngoài, kiểm soát sự thâm nhập của vi rút vào tế bào người.



Hình 1.9. Mô hình cấu trúc gen của vi rút thuộc nhóm Flavivirus [91]

Hệ gen của Flavivirus là một ARN sợi đơn (+) có cấu trúc CAP ở đầu 5' and và đặc biệt thiếu đuôi poly-A ở đầu 3' [76]. Bộ gen của vi rút mã hóa cho một polyprotein đơn, sau khi được phiên mã bởi các protease của vi rút và vật chủ, tạo thành 3 protein cấu trúc (C-prM-E) và 7 protein phi cấu trúc (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) [142]. Bao quanh khu vực mã hóa protein của bộ gen vi rút là hai cấu trúc UTR khoảng 100 nucleotide ở đầu 5' và khoảng 400 – 700 nucleotide ở đầu 3'.



Hình 1.10. Cấu trúc sợi đơn ARN của Flavivirus [76]

Đầu 5' và 3' gồm nhiều chuỗi và cấu trúc ARN cần thiết cho sự sao chép, dịch mã của bộ gen vi rút. Đầu 5' được chia thành hai domain. Domain đầu tiên nằm trong 5'UTR và chứa cấu trúc vòng lặp stem-loop A (SLA) phân nhánh, một tính năng được bảo tồn trong toàn bộ chi Flavivirus (hình 1.9). SLA đóng vai trò

điều khiển cho quá trình nhân lên của vi rút. Domain thứ hai mở rộng từ 5'UTR vào C ORF. Miền này chứa vùng AUG (5'UAR) gấp lại tạo thành cấu trúc vòng lặp thứ hai (SLB), phía sau của vùng AUG (DAR), cấu trúc kẹp tóc mã hóa cho C region (C coding region hairpin - cHP), 5' cyclization sequence (5'CS) và 5'CS pseudoknot (DCS-PK) [104].

Vùng 3' của bộ gen Flavivirus được chia thành ba domain riêng biệt, tất cả đều nằm trong 3'UTR. Domain I, trước đây được gọi là vùng biến đổi, được bảo tồn ít nhất. Đáng chú ý là sự hiện diện của hai cấu trúc vòng lặp (SLI và SLII) tạo thành pseudoknots (PK1 và PK2) (Hình 1.9). Do khả năng kháng của chúng với 5' và 3' exonuclease Xrn1, hai cấu trúc này được gọi là kháng exonuclease RNA1 và xrRNA2. Hai cấu trúc này rất quan trọng đối với sự hình thành của hai dạng subgenomic ARN Flavivirus (sfRNA). Các sfRNA này (sfRNA1 và sfRNA2) đóng vai trò cực kỳ quan trọng trong việc ngăn chặn khả năng miễn dịch bẩm sinh của vật chủ và thích ứng với các vật chủ khác nhau. Các cấu trúc xrRNA từ vi rút Murray Valley encephalitis và ZIKV đã được nghiên cứu ở mức độ phân tử, minh chứng cho tính kháng exonuclease của các ARN này [31].

Domain II của đầu 3' chứa một (ZIK, YFV) hoặc hai (DENV, JEV) cấu trúc dumbbell (DB1 và DB2) bảo tồn, chứa các chuỗi cần thiết cho cả quá trình sao chép và dịch mã của vi rút. Các cấu trúc DB này được dự đoán tạo thành cấu trúc pseudoknot (PK3 và PK4) cần thiết cho vai trò của chúng trong dịch mã và cũng có thể có chức năng như một Xrn1-stalling sites bổ sung theo đặc tính của từng loài [87].

Domain III được bảo tồn cao nhất ở tất cả các thành viên thuộc chi Flavivirus và chứa các chuỗi 3'DAR, 3'CS và 3'UAR tương tác với các vùng tương ứng nằm ở đầu 5' của bộ gen và đóng vai trò chính trong điều hoà chu trình và nhân rộng bộ gen vi rút. Cuối cùng, domain III chứa cấu trúc vòng lặp 3' stem-loop structure (3'SL) giữ ở đầu 5' bằng cấu trúc kẹp tóc (sHP) và đóng vai trò chính trong quá trình tổng hợp ARN [175].

1.2.2. Sự nhân lên của vi rút thuộc nhóm Flavivirus

Một protein tiền chất lớn được dịch mã từ các mARN có độ dài tương tự hệ gen trong quá trình vi rút nhân lên, được cắt bởi các protease của vi rút và vật chủ để tạo ra tất cả các protein của vi rút, cả protein cấu trúc và phi cấu trúc. Các

Flavivirus nhân lên trong tế bào chất và lắp ráp hạt vi rút xảy ra trong các túi nội bào. Sự tăng sinh của các màng nội bào là một đặc tính của các tế bào nhiễm Flavivirus [120]. Các bằng chứng cho thấy Flavivirus xâm nhập vào tế bào thông qua các thụ thể gián tiếp trên các thực thể bào, liên quan đến cấu trúc protein E trên vỏ vi rút và thụ thể trên màng tế bào chất vật chủ. Đối với các tế bào của động vật có xương sống việc phá hủy tế bào và các thay đổi siêu cấu trúc như tạo các không bào và tăng sinh màng nội bào có thể quan sát được trong quá trình bị nhiễm Flavivirus. Khi vi rút xâm nhập vào các tế bào động vật có xương sống thường dẫn đến việc hủy hoại tế bào (CPE), tuy nhiên đối với tế bào của các động vật chân khớp như tế bào muỗi *Aedes albopictus* C6/36 việc lây nhiễm Flavivirus gần như không xuất hiện hiện tượng hủy hoại tế bào, sự nhân lên của vi rút được quan sát bằng kính hiển vi điện tử với kỹ thuật soi trực tiếp hỗn dịch nuôi cấy hoặc kỹ thuật cắt lát mỏng trên tế bào nuôi cấy [50].

1.2.3. Đặc tính kháng nguyên (tham khảo thêm)

Các Flavivirus đều chung vị trí kháng nguyên. Ít nhất tám khu phức hợp kháng nguyên đã được xác định dựa trên các xét nghiệm trung hòa. Protein vỏ của vi rút là hemagglutinin có chứa các quyết định đặc hiệu tít, nhóm và serocomplex. So sánh trình tự của các glycoprotein cho thấy vi rút trong cùng một serocomplex giống nhau tới hơn 70% trình tự axit amin, trong khi tương đồng axit amin giữa các serocomplex là dưới 50% [120].

Flavivirus có chung cấu trúc hạt, trong đó DENV và ZIKV được mô tả điển hình nhất. Hạt DENV trưởng thành dạng hình cầu có đường kính 50 nm. Lớp ngoài cùng của virion là lớp vỏ glycoprotein được tạo thành từ vòng lặp của 180 protein protein vỏ (E) kết hợp với protein màng (M). Các công trình nghiên cứu đã chứng minh rằng protein E của Flavivirus bao gồm domain gốc và ba domain khác, cụ thể là DI, DII và DIII, trong đó DI là cầu nối giữa DII và DIII. Vòng hợp hạch nằm ở đầu DII rất quan trọng đối với sự tương tác và hợp nhất với màng của vật chủ, trong khi DIII được cho là có vai trò liên kết với các thụ thể của vật chủ. Mặc dù vỏ bọc vi rút thường được mô tả như một cấu trúc tĩnh, cấu trúc protein E lại tồn tại dưới dạng một quần thể động và không đồng nhất [91].

1.2.4. Phương pháp chẩn đoán Flavivirus trong phòng thí nghiệm

Các phương pháp chẩn đoán phòng thí nghiệm để khẳng định nhiễm Flavivirus: Phát hiện ARN của vi rút, phân lập vi rút, kháng thể đặc hiệu kháng/trung hoà vi rút và kết hợp các kỹ thuật này.

Lựa chọn phương pháp chẩn đoán phòng thí nghiệm phù hợp dựa vào đặc điểm lưu hành của vi rút, giai đoạn của bệnh. Bệnh nhân với các biểu hiện lâm sàng có thể áp dụng phương pháp sinh học phân tử và huyết thanh học trong 5-7 ngày đầu của bệnh, giai đoạn > 7 ngày sau khởi phát sẽ chỉ áp dụng phương pháp huyết thanh học. Bệnh phẩm là huyết thanh, plasma, máu toàn phần, dịch não tủy, nước bọt, nước tiểu.

Bảng 1.1. Các phương pháp xét nghiệm chẩn đoán vi rút nhóm Flavivirus [25]

Phương pháp	Bệnh phẩm	Thời gian
Sinh học phân tử: -RT-PCR -Realtime RT-PCR	Huyết thanh, huyết tương, máu toàn phần, dịch não tủy, nước bọt, nước tiểu (ZIKV)	< 7 ngày sau khởi phát
Phát hiện kháng nguyên: -Phân lập vi rút -ELISA-NS1 (DENV) -Test nhanh phát hiện NS1 (DENV)	Huyết thanh	< 7 ngày sau khởi phát
Phát hiện kháng thể: -ELISA (IgM, IgG) -Trung hoà giảm đám hoại tử (PRNT)	Huyết thanh, dịch não tủy	> 7 ngày sau khởi phát

1.2.4.1. Phát hiện ARN vi rút

Chẩn đoán bệnh dựa trên các xét nghiệm phòng thí nghiệm đối với các trường hợp đang trong giai đoạn nhiễm DENV, ZIKV cấp tính (trong vòng 7 ngày sau khi khởi phát) đều dựa vào phát hiện ARN trong mẫu của bệnh nhân bao gồm mẫu huyết thanh, huyết tương, mẫu nước tiểu, mẫu nước bọt và dịch màng ối...

[196]. Đối với ZIKV, trong một số trường hợp nơi xảy ra ca bệnh không thực hiện được các xét nghiệm sinh học phân tử, mẫu giấy lọc có giọt máu khô được chuyển đến các cơ sở khẳng định bệnh như các phòng xét nghiệm hợp tác với TCYTĐG là một lựa chọn an toàn và không tốn kém do có thể vận chuyển loại mẫu này ở nhiệt độ thường [194]. Với vật chất di truyền là ARN, phản ứng thực hiện để phát hiện DENV, ZIKV là RT-PCR hoặc Realtime RT-PCR trong đó Realtime RT-PCR cho thời gian trả kết quả nhanh hơn RT-PCR truyền thống [193]. Quy trình RT-PCR được sử dụng phát hiện DENV, ZIKV hiện nay tập trung vào đoạn gen đích mã hóa vỏ vi rút (E-encoding gene), mã hóa màng vỏ (M/E-encoding gene), mã hóa (pE) và mã hóa protein NS5, NS3, NS1 [194, 196].

1.2.4.2. Phương pháp phân lập vi rút

Phân lập vi rút là tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán và nghiên cứu vi rút. Bệnh phẩm lâm sàng được thu thập từ bệnh nhân nghi ngờ nhiễm vi rút trong giai đoạn cấp, được nuôi cấy trên các dòng tế bào cảm nhiễm có nguồn gốc từ muỗi (C6/36, CLA-1...), có nguồn gốc từ động vật có vú (Vero, BHK-21) hoặc trên muỗi sống. Phân lập DENV được thực hiện trên tế bào C6/36, BHK-21. Phân lập ZIKV từ huyết thanh khi và muỗi *Ae. africanus* được thực hiện đầu tiên trên mẫu não chuột gây nhiễm ZIKV. Trên người, ZIKV cũng được phân lập thành công từ mẫu máu, mẫu tinh dịch và mẫu nước tiểu. Mặc dù chưa được phân lập thành công từ mẫu sữa mẹ nhưng phản ứng RT-PCR đã phát hiện ZIKV trong loại mẫu này.

Thành công trong phân lập vi rút phụ thuộc rất nhiều vào thời điểm lấy mẫu sau khi khởi phát. Phương pháp phân lập vi rút thường kéo dài từ 1-3 tuần, vì vậy không đáp ứng được yêu cầu chẩn đoán nhanh, tuy nhiên kết quả thu được bằng phương pháp này cung cấp nhiều thông tin vi rút phục vụ nghiên cứu vi rút học, bệnh học và phát triển vắc xin [194].

1.2.4.3. Phát hiện kháng thể kháng/trung hoà Flavivirus

Chẩn đoán nhiễm DENV, ZIKV thông qua xác định kháng thể kháng đặc hiệu hoặc kháng thể trung hoà vi rút. Kỹ thuật ELISA tóm bắt IgM, IgG được áp dụng và trở thành thường quy trong chẩn đoán DENV. Khẳng định nhiễm ZIKV ở người bằng việc phát hiện kháng thể trung hoà ZIKV trong mẫu huyết thanh [196].

Tuy nhiên, phát hiện nhiễm DENV, ZIKV bằng phương pháp huyết thanh học sẽ phức tạp tại những nơi lưu hành nhiều vi rút thuộc nhóm Flavivirus (DENV, VNNB B, sốt vàng) vì các vi rút này đều có chung các dấu ấn kháng nguyên trên protein E và tạo ra các phản ứng miễn dịch chéo, đây cũng là hạn chế của phương pháp huyết thanh học chẩn đoán nhiễm DENV, ZIKV. Do đó, kết quả dương tính sử dụng các xét nghiệm huyết thanh học cần phải được khẳng định bằng các xét nghiệm khác như xét nghiệm trung hòa giảm đám hoại tử -PRNT [195].

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu sau vụ dịch do ZIKV tại đảo Yap được tiến hành tại phòng thí nghiệm của Trung tâm Kiểm soát bệnh tật địa phương đã chỉ ra rằng mẫu bệnh nhân thu thập trong 9 ngày kể từ khi xuất hiện triệu chứng sẽ có phản ứng chéo đối với các Flavivirus khác trong cả phản ứng ELISA phát hiện IgM và PRNT [196]. Mặc dù phương pháp PRNT được cho là “tiêu chuẩn vàng” trong việc xét nghiệm kháng thể trung hoà các loại Flavivirus khác nhau [194].

1.2.5. Bệnh do Flavivirus lây truyền qua véc tơ đang lưu hành ở Việt Nam

1.2.5.1. Viêm não Nhật Bản

Tại Việt Nam, giám sát hội chứng viêm não cấp (HCVNC) nghi ngờ do vi rút là cơ sở để chẩn đoán/giám sát bệnh nhân Viêm não Nhật Bản (VNNB). Giám sát tỷ lệ mắc VNNB trong nhiều năm cho thấy có sự thay đổi do tác động của vắc xin phòng bệnh. Tỷ lệ mắc VNNB trong giai đoạn năm 1994 - 1996 là 4,16-4,78/100.000 dân; từ năm 1996 - 2000 tỉ lệ mắc giảm còn 2,57 - 4,16/100.000 dân và từ năm 2001 - 2004 tỉ lệ mắc còn là 2,75 - 2,82/100.000 dân [5, 7, 186]. (cập nhật số liệu gần thời gian nghiên cứu 2010-2018...)

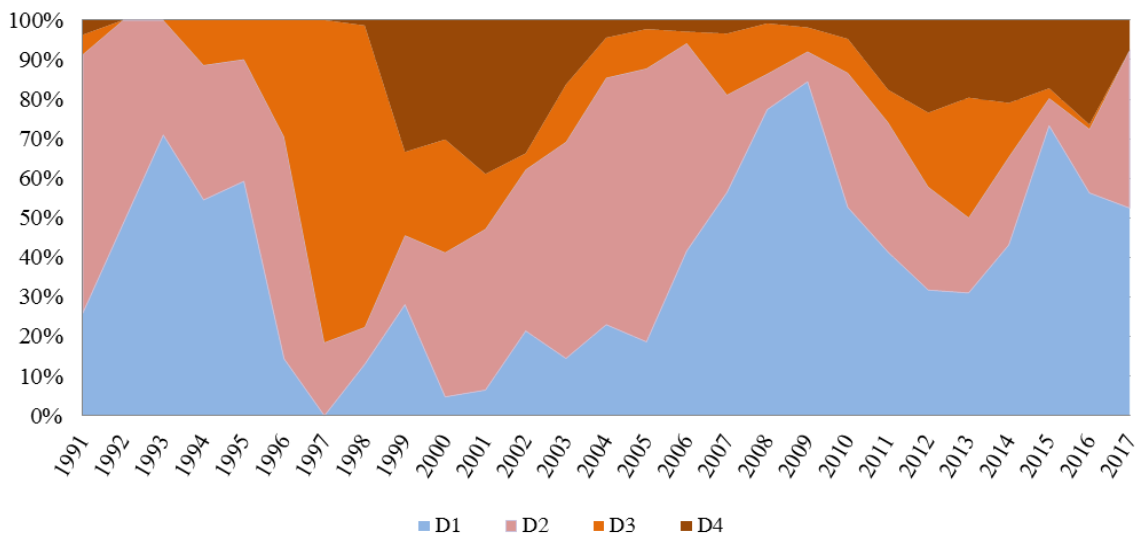
Năm 2014, tỷ lệ mắc và tử vong do VNVR tại Sơn La và Điện Biên cao nhất trong cả nước lần lượt là 17,13 ca và 18,74 ca/100.000 dân, tỷ lệ tử vong lần lượt là 1,79 ca và 0,56 ca/100.000 dân. Trong những năm trước đây, các nghiên cứu về hội chứng viêm não cấp, viêm não vi rút (VNVR) ở miền Bắc Việt Nam phần nhiều tập trung ở đồng bằng sông Hồng, do khu vực này thường ghi nhận số ca mắc cao hơn, các vụ dịch xảy ra thường xuyên hơn [4]. Nhưng đến nay có vẻ như bệnh đã có sự dịch chuyển dần từ khu vực đồng bằng đến khu vực miền núi Tây Bắc.

Căn nguyên gây HCVNC ở Việt Nam được xác định chủ yếu là do vi rút VNNB. Những năm gần đây, nhờ hiệu quả của chương trình tiêm chủng mở rộng, bệnh VNNB đã giảm hơn, ít xảy ra dịch lớn, tuy nhiên vẫn còn là một trong những bệnh hay gặp trong nhóm bệnh nhiệt đới. Tỷ lệ mắc bệnh ở trẻ trai cao hơn trẻ gái, bệnh gặp nhiều hơn vào mùa hè, chủ yếu vì tính chất theo mùa của VNNB [1].

Tại Việt Nam năm 2007 – 2010, VNNB là nguyên nhân của 33% ca viêm não/viêm màng não vi rút ở trẻ em. VNNB là nguyên nhân phổ biến gây viêm não ở nhóm trẻ 1 – 14 tuổi, nhưng lại hiếm gặp ở nhóm dưới 1 tuổi và trên 15 tuổi [122]. VNNB hiếm khi xảy ra ở người trưởng thành tại các khu vực có dịch lưu hành do những người này đã trải qua thời gian dài phơi nhiễm với vi rút và có thể đã có miễn dịch [163].

1.2.5.2. Sốt xuất huyết Dengue

Tại Việt Nam, vụ dịch SXHD đầu tiên xảy ra ở khu vực miền Bắc vào năm 1958 và ở khu vực phía Nam vào năm 1960 với 60 bệnh nhân nhi đã được ghi nhận tử vong. Từ đó bệnh trở thành dịch lưu hành địa phương ở vùng Châu thổ sông Hồng, sông Cửu Long và dọc theo bờ biển miền Trung [8, 11, 13].



Hình 1.11. Phân bố của các tít huyết thanh Dengue lưu hành ở Việt Nam [14]

Giai đoạn từ năm 1999-2003, sau khi có Chương trình sốt xuất huyết Dengue Quốc gia, số mắc và số tử vong trung bình hàng năm đã giảm đi tương ứng chỉ còn

khoảng 36.826 ca và 66 trường hợp, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân là 42,4 tỷ lệ chết trên mắc xuống rất thấp 0,024% [8, 11, 13]. Năm 2007 là năm có số mắc và chết do SXHD cao nhất kể từ sau vụ dịch năm 1998, tổng số có 104.464 trường hợp mắc SXHD, trong đó 88 trường hợp tử vong, tỷ lệ mắc trên 100.000 dân là 122,61 và tỷ lệ chết trên mắc là 0,08%. Tuy nhiên, năm 2009 số ca mắc còn cao hơn năm 2007, với 105.370 trường hợp mắc SXHD, trong đó 87 trường hợp tử vong. Số ca mắc tiếp tục tăng trong 2010, cả nước đã ghi nhận 128.710 trường hợp mắc SXHD và 109 trường hợp tử vong. Số ca mắc SXHD ghi nhận đang có chiều hướng gia tăng năm sau ghi nhận nhiều hơn năm trước trong giai đoạn 2012 - 2017. Chỉ tính hết tháng 11 năm 2017, số ca mắc SXHD ghi nhận được trên toàn quốc là 171.000 trường hợp. Có thể nói SXHD đang là một trong mười bệnh truyền nhiễm có tỷ lệ mắc và tử vong cao nhất trong 10 năm trở lại đây, tỷ lệ mắc do SXHD đứng hàng thứ tư và tỷ lệ tử vong đứng thứ năm. Ở Việt Nam, số người nằm trong vùng có dịch bệnh lưu hành chiếm khoảng 90% dân số toàn quốc [2, 3, 14].

Do đặc điểm địa lý, khí hậu khác nhau, ở miền Nam và miền Trung bệnh xuất hiện quanh năm, ở miền Bắc và Tây Nguyên bệnh thường xảy ra từ tháng 6 đến tháng 11. Những tháng còn lại trong năm bệnh ít xảy ra vì thời tiết lạnh, ít mưa, không thuận lợi cho sự sinh sản và hoạt động của đàn muỗi là véc tơ truyền bệnh. Tính chung trên cả nước, dịch bệnh được ghi nhận nhiều nhất vào tháng 7 đến tháng 10 hàng năm. Từ năm 2011 - 2014 ghi nhận số mắc tại 55/63 tỉnh/thành phố, trong đó khu vực Miền Nam có tỷ lệ mắc cao nhất chiếm 68,6% tổng số các trường hợp mắc. Tử vong do SXHD ghi nhận tại 32/63 tỉnh, thành phố, trong đó chủ yếu tại các tỉnh phía Nam và trẻ em dưới 15 tuổi. Ở Miền Bắc, Dengue chiếm tới 90% số ca bệnh, Hà Nội ghi nhận là địa phương thứ hai có dịch xảy ra, ca bệnh ghi nhận hàng năm đạt đỉnh vào tháng 9, tháng 10 và tháng 11, diễn biến dịch tại đây cũng giống như các khu vực Miền Nam và Miền Trung. Ca bệnh chủ yếu tập trung vào khu vực nội thành và có xu hướng lan rộng ra các vùng ven nội và dịch chuyển về khu vực phía Tây Nam Hà Nội [2, 3, 14]. Thông thường, SXHD được ghi nhận ở vùng đô thị, sau đó lan ra vùng nông thôn rồi khu vực miền núi, cao nguyên như Hương Khê, tỉnh Hà Tĩnh năm 2010 hay khu vực du lịch như thành phố Hạ Long, Quảng Ninh năm 2011,

và một số tỉnh biên giới phía Bắc. Các năm gần đây khu vực miền núi như Hát Lót, Sơn La liên tục ghi nhận các ổ dịch SXHD từ vài chục đến vài trăm trường hợp mắc [10].

1.2.5.3. Zika

Vi rút Zika (ZIKV) là arbovirus - các vi rút có véc tơ truyền bệnh là động vật chân khớp, thuộc chi Flavivirus, họ Flaviviridae. Tương tự một số loài vi rút lây truyền bệnh qua muỗi như vi rút Dengue (DENV), vi rút sốt vàng (YFV) và vi rút Chikungunya (CHIKV), ZIKV truyền bệnh qua muỗi thuộc loài Aedes, là nguyên nhân gây nên sốt Zika. Những ca sốt Zika chưa được phân loại một cách hệ thống với triệu chứng lâm sàng rất dễ nhầm lẫn với các ca sốt gây nên do vi rút Dengue hoặc vi rút Chikungunya như phát ban, viêm kết mạc, đau khớp [196].

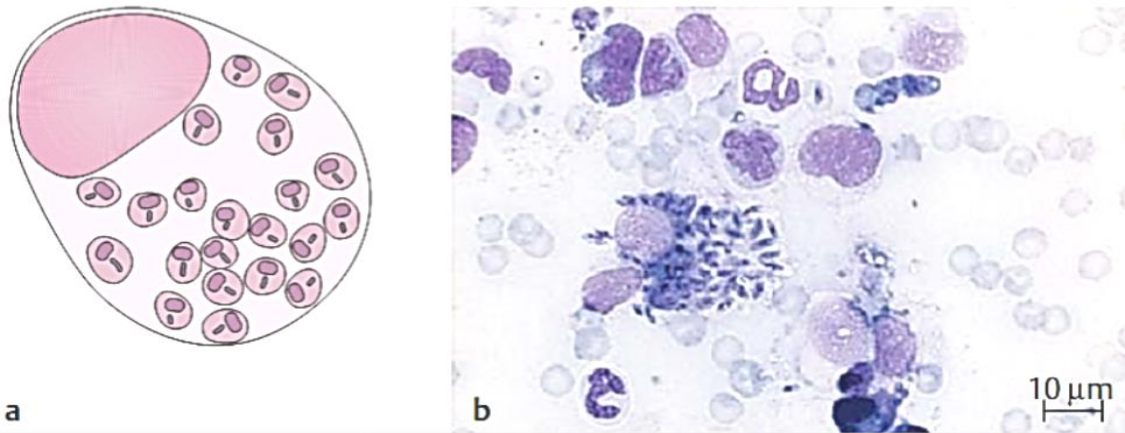
Tại Việt Nam, ZIKV lần đầu tiên được báo cáo là du khách người Israel vào năm 2015 và sau đó du khách người Hàn Quốc năm 2016. Ngoài ra, 02 trường hợp nhiễm ZIKV tại địa phương là một phụ nữ 64 tuổi tại Nha Trang và một phụ nữ 33 tuổi tại Hồ Chí Minh được báo cáo vào tháng 4 năm 2016. Tổng cộng đã có 219 trường hợp nhiễm ZIKV được báo cáo vào năm 2016 và 13 trường hợp vào 2 tháng đầu năm 2017 [60]. Trường hợp trẻ có triệu chứng dị tật bẩm sinh mắc chứng đầu nhỏ có nhiều khả năng nghi liên quan đến vi rút Zika và cũng là trường hợp đầu tiên ở Việt Nam được ghi nhận vào tháng 10/2016 tại Đắk Lắk. Kết quả xét nghiệm kháng thể IgM kháng vi rút Zika và kháng thể trung hoà dương tính trong mẫu huyết thanh của trẻ, mẹ và những người thân sống cùng trong gia đình. Qua điều tra dịch tễ cho thấy về biểu hiện bệnh, người mẹ có biểu hiện lâm sàng mắc bệnh vào lúc có thai 3 tháng.

1.3. LEISHMANIA VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ

1.3.1. Bậc phân loại của Leishmania

- Giới *Protista* (Haeckel, 1866),
- Lớp *Kinetoplastea* (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976),
- Phân lớp *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004),
- Bộ *Trypanosomatida* (Kent, 1880),
- Họ *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901),
- Phân họ *Leishmaniinae* (Maslov and Lukeš 2012)

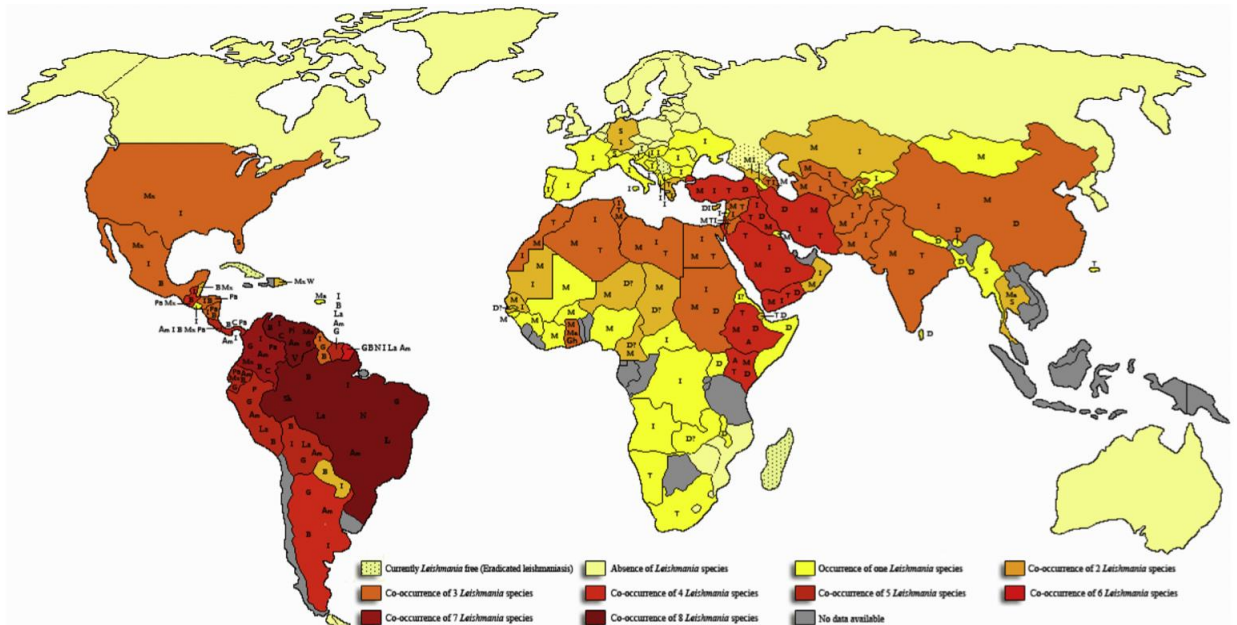
- Giống *Leishmania* (Ross, 1903).



Hình 1.12. a. *Leishmania* trong đại thực bào, b: *Leishmanias infantum* trong đại thực bào bị phá hủy, nhuộm Giemsa vết bôi tuỷ xương [84]

1.3.2. Ký sinh trùng *Leishmania* và chu kỳ sống

Có khoảng 21 loài thuộc giống *Leishmania* gây bệnh cho con người, giữa chúng không có sự khác biệt về hình thái. Có thể phân biệt chúng trên cơ sở các tiêu chí sinh học, hoặc phân tích trong phòng thí nghiệm (chủ yếu là phân tích isoenzym và phân tích ADN), hoặc những triệu chứng lâm sàng và dịch tễ học khác nhau [28].

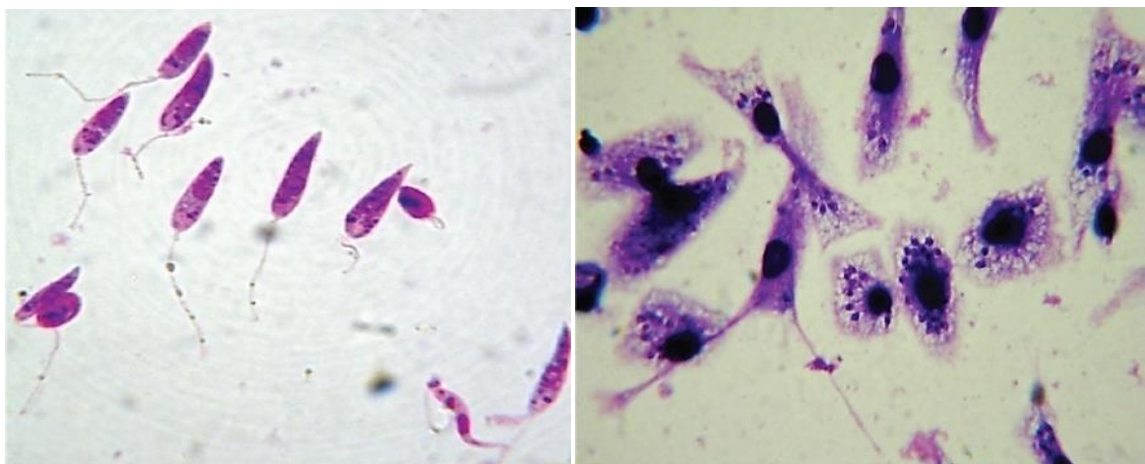


Hình 1.13. Bản đồ phân bố của 21 loài *Leishmania* gây bệnh cho người [28]

A: *L. aethiopica*; Am: *L. amazonensis*; B: *L. braziliensis*; C: *L. colombiensi*; D: *L. donovani*; G: *L. guyanensis*; Gh: *chủng Ghana*; I: *L. infantum*; La: *L. lainsoni*; L: *L. lindenbergi*; M: *L. major*; Ma: *L. martiniquensis*; Mx: *L. mexicana*; N: *L. naiffi*; Pa: *L. panamensis*; P: *L. peruviana*; S: *L. siamensis*; Sh: *L. shawi*; T: *L. tropica*; V: *L. venezuelensis* và W: *L. waltoni*.

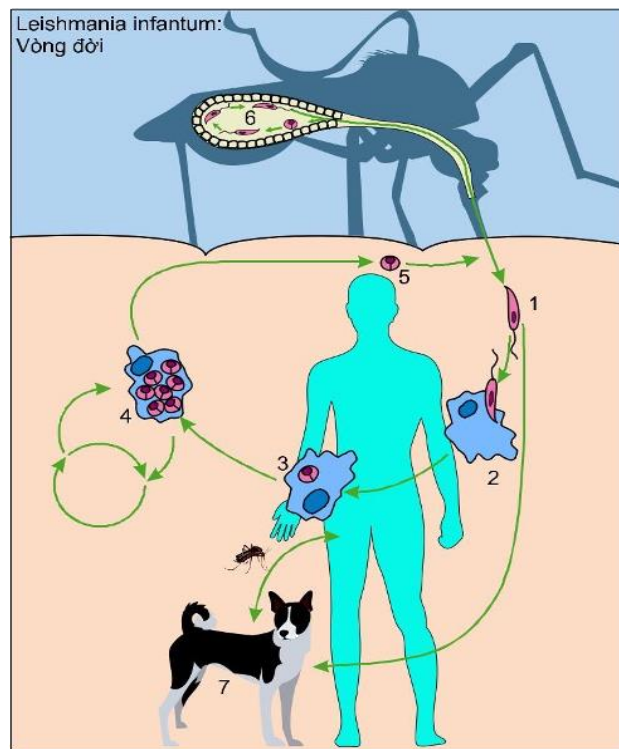
Ở người và động vật có xương khác, *Leishmania* ký sinh trong các thực bào đơn nhân (đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào Langerhans) dưới dạng amastigote. Nhuộm Giemsa có thể nhận ra chúng dưới kính hiển vi quang học, tế bào tròn đến hình bầu dục đường kính 2 - 5 μm với một nhân và kinetoplast hình que nhỏ. Dưới kính hiển vi điện tử cũng có thể quan sát được sợi roi, ty thể và các bào quan khác [84].

Các loài *Leishmania* được truyền bởi muỗi cái thuộc các giống *Phlebotomus* (Cổ thể giới) và *Lutzomyia* (Tân thể giới) được gọi là muỗi cát. Giai đoạn amastigote của ký sinh trùng theo máu vào đường ruột của côn trùng, chuyển sang dạng promastigote mảnh có roi, dài 10 - 15 μm , chúng nhân lên và di chuyển trở lại vòi của muỗi cát. Với nhiệt độ khu vực nhiệt đới, quá trình này mất từ 5 đến 8 ngày. Muỗi cát mang các promastigote truyền vào một vật chủ mới khi hút máu. Trong vật chủ, chúng xâm nhập bằng cách kết nối với thành tế bào vật chủ (IgM, bổ thể, thụ thể erythrocyte) và do vậy gắn một vài thụ thể đại thực bào. Sau đó chúng bị thực bào và đóng gói trong phagolysosome, và tránh được sự tác động của enzym của lysosome nhờ các hợp chất bên trong màng tế bào. Promastigote nhanh chóng chuyển sang giai đoạn amastigote (khoảng 12 - 14 giờ), sau đó chúng được bao quanh bởi không bào parasitophorous trong phagolysosome và tiến hành sinh sản bằng cách phân đôi. Các thể amastigote này sau đó được phát tán thông qua quá trình xuất bào và có thể lây nhiễm các tế bào mới (Hình 1.14) [84].



Hình 1.14. Dạng promastigotes và amastigotes nhuộm Giemsa vật kính 100 [84]

Chu kỳ phát triển phải qua hai vật chủ: vật chủ vĩnh viễn là người hoặc động vật, véc tơ truyền bệnh là muỗi cát. Khi muỗi cát đốt người hoặc động vật mang bệnh, hút luôn thể amastigote vào dạ dày của nó. Trong ruột muỗi cát, ký sinh trùng sẽ chuyển từ dạng không roi sang dạng có roi (promastigote), tăng sinh và sau đó sẽ di chuyển lên vòi muỗi cát, không xâm nhập vào tuyến nước bọt. Trong vòng 8 - 15 ngày, thể này có khả năng gây nhiễm. Khi muỗi cát đốt người (động vật) sẽ truyền ký sinh trùng này vào vật chủ [84].



Hình 1.15. Vòng đời của *Leishmania infantum* [84]

1. Sự truyền thể promastigoye bởi muỗi cát; 2. Phagocyto thực bào kí sinh trùng (tế bào Langerhans, tế bào dendritic, đại thực bào); 3. Dạng amastigote trong đại thực bào; 4. Sự nhân lên của các amastigote trong các đại thực bào; 5. Muỗi cát hút phải amastigote theo máu; 6. Chuyển thành dạng promastigote và nhân lên trong muỗi cát; 7. Chó là vật chủ.

1.3.3. Đặc điểm bộ gen của *Leishmania*

Leishmania có bộ gen khác biệt hơn so với sinh vật nhân chuẩn, như gen không có intron, polycistron và nhiễm sắc thể nhỏ với mật độ gen cao. Hơn nữa, những con trùng roi này sở hữu một ty thể duy nhất được gọi là kinetoplast, chứa một mạng lưới lớn ADN kinetoplast (kDNA) [106].

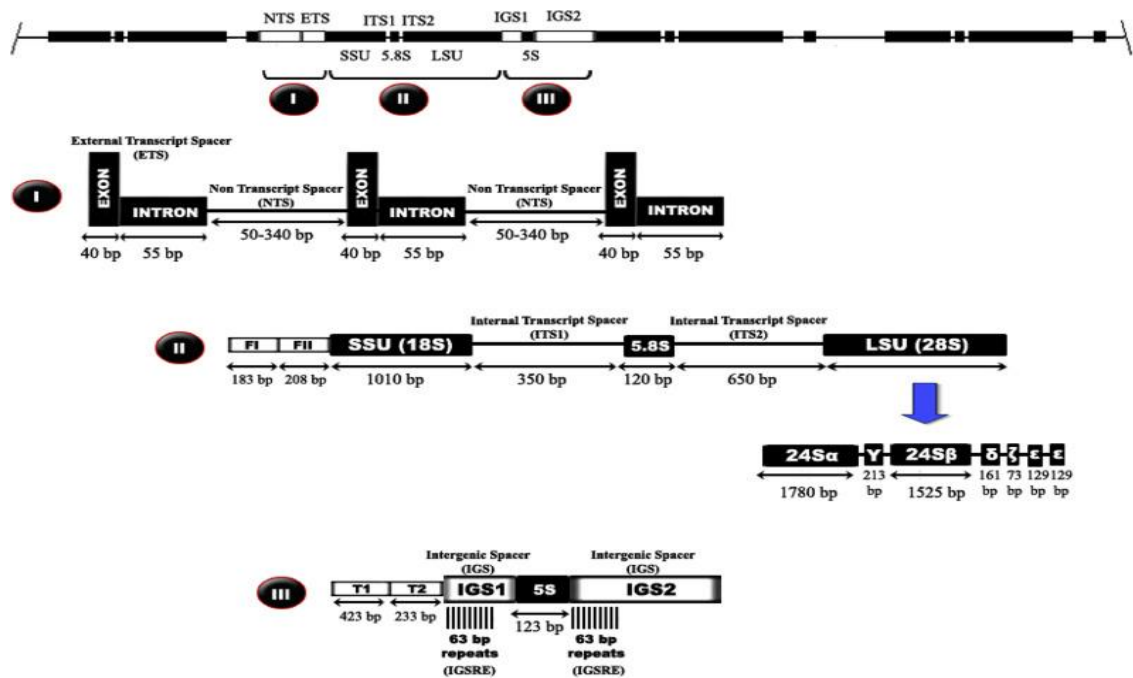
Các dấu hiệu di truyền được sử dụng để phát hiện *Leishmania* ở cấp độ giống

bằng PCR và các phương pháp phân tử khác. Tùy thuộc vào mục tiêu và môi PCR tương ứng, các xét nghiệm có thể đặc trưng cho từng giống, phân giống hoặc thậm chí là đặc trưng cho loài.

1.3.3.1. ADN nhiễm sắc thể

ADN ribosome (rDNA)

Các gen ARN ribosome (rRNA) nằm hầu hết trên nhiễm sắc thể số 27, thường tồn tại nhiều bản sao với kích thước xấp xỉ 12,5 kb [185]. Trong số các thành phần khác nhau của các gen này, các vùng bộ đệm phiên mã trong (Internal transcribed spacer – ITS) lý tưởng cho việc định loài [90, 153]. Giống như hầu hết các sinh vật nhân chuẩn, các tiểu đơn vị lớn của ribosome (LSU) bao gồm 28S, 5,8S và 5S rRNA, trong khi tiểu đơn vị nhỏ (SSU) chứa 18S rRNA. Các rRNA 18S, 5,8S và 28S được mã hóa bởi một đơn vị phiên mã duy nhất được gọi là cistron của ribosome được phiên mã bởi ARN polymerase I để tạo ra một phiên mã chính lớn (45S hoặc tiền rRNA) [176]. Gen 5S rRNA được phiên mã riêng rẽ bởi ARN polymerase III. Quá trình xử lý các bản sao dẫn đến việc loại bỏ các bộ đệm được phiên mã bên trong và bên ngoài (tương ứng là ITS và ETS), chúng bị suy thoái nhanh chóng. Do đó, đơn vị rRNA bao gồm vùng phiên mã và vùng giữa gen (còn gọi là vùng đệm giữa gen) bao gồm vùng đệm không phiên mã (NTS) và ETS [162]. Các trình tự lặp lại trong các bộ đệm giữa các gen hoặc NTS là đối tượng của quá trình tiến hóa phối hợp, bởi vì có một trình tự rộng rãi giữa các bộ đệm trong một loài nhưng ít tương đồng giữa các bộ đệm của các loài liên quan [113]. Trong một đơn vị lặp lại duy nhất, vùng mã hóa xấp xỉ 9 kb (tùy thuộc vào loài *Leishmania*), trong khi vùng NTS có độ dài khác nhau từ 4 đến 12 kb.



Hình 1.16. Bản đồ di truyền gen rDNA (nằm trong nhiễm sắc thể số 27) với độ dài đoạn tương ứng ở các loài *Leishmania* [28]

Đơn vị phiên mã ARN của ribosome

Các 18S rRNA là một ARN cấu trúc của SSU ribosome. Sự bảo tồn cao của gen này và các vùng bên sườn của nó làm cho nó thích hợp để tái tạo lại các mối quan hệ phát sinh loài. Các 5.8S rRNA là một thành phần không mã hóa của LSU ribosome, và là một phần của 45S tiền thân mà cũng chứa 18S và 28S rRNAs. Các 28S rRNA đóng vai trò như một ribozyme, xúc tác liên kết peptit hình thành. Các loài *Leishmania* không điển hình trong thành phần của nó, vì chúng chứa hai phân tử lớn (24S α và 24S β) và bốn phân tử rRNA nhỏ (Y, ζ , δ , ϵ) [164]. Cuối cùng, 5S rRNA dài 120 nt là một thành phần cấu trúc và chức năng của LSU của ribosome [154]. Goen 5S rRNA thường không liên kết với cistron của ribosom [130]. Do kích thước nhỏ và do đó hàm lượng thông tin thấp, nó hiếm khi được sử dụng cho phát sinh loài phân tử.

Internal transcribed spacer (ITS)

Bộ đệm phiên mã bên trong (ITS) đề cập đến ADN bộ đệm không mã hóa nằm giữa rRNA SSU và LSU. Vùng ITS1 dao động từ 50 đến 350 bp và nằm giữa các gen rRNA 18S và rRNA 5,8S [152]. Nó có mức bảo tồn đủ cao để phân

biệt phức hợp loài *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. major*, *L. turanica* và *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* [52, 125, 152, 153, 192]. Vùng ITS2 dài 50–650 bp và nằm giữa các gen rRNA 5,8S và LSU. Khuếch đại ITS2 với mỗi PCR chung cho thấy sự khác biệt đáng kể giữa các loài *Leishmania* của Cổ thể giới và Tân thể giới; giữa các phức hợp loài và các loài thuộc chi *Leishmania* [90, 152]. Các vùng ITS (bao gồm ITS1 và ITS2) này cũng được xem xét là mục tiêu thích hợp để định loại các giống *viannia* [52].

Intergenic spacer region (IGS)

IGS là một yếu tố bộ gen khác nhau về kích thước, số lượng và trình tự giữa các loài *Leishmania* và các loài phân lập. Các IGS của *Leishmania* chứa một yếu tố lặp lại độ dài 60-64 bp và khoảng 16-275 bản sao, chiều dài 4-12 Kbp [127]. Kích thước của vùng IGS giống nhau ở các loài *Sauropus* *Leishmania* và *Leishmania*, chứng tỏ khả năng bảo tồn của nó ở cấp độ phân giống. IGS ít được bảo tồn hơn các gen rRNA và do đó phù hợp hơn để lập bản đồ các mối quan hệ tiến hóa giữa các loài *Leishmania* có liên quan chặt chẽ.

Mini-exon

Các kinetoplas hiện diện trong 100-200 bản lặp lại mỗi gen hạt nhân và đã được sử dụng cho các nghiên cứu phát sinh loài *Leishmania* [37, 190]. Mỗi lần lặp lại bao gồm ba phần chính:

- Exon dài 39 bp được phiên mã (hoặc exon nhỏ) được bảo toàn cao giữa các vị trí 1-9 và 21 - 39 [167];
- Một intron được bảo tồn vừa phải, có kích thước từ 55 đến 101 bp;
- Một bộ đệm có độ biến thiên cao không được phiên mã (51 - 341 bp) được sử dụng để định kiểu gen *Leishmania*.

Sự thay đổi kích thước của nó cho phép phân biệt sơ bộ phức hợp *Leishmania* giữa Cổ thể giới và Tân thể giới [64, 72, 112, 138]. Mini-exon 39 bp có thể được sử dụng để định lượng sự biểu hiện gen vì nó hiện diện ở đầu 5' của mRNA [73].

Bộ đệm phiên mã ngoài (ETS)

Một vùng ARN có liên quan chặt chẽ với ITS và nằm bên ngoài rRNA cấu trúc trên một phiên mã tiền thân chung. Vùng ETS dài khoảng 1 Kb của các loài *Leishmania* có kích thước tương tự giữa các loài: *L. amazonensis* (1050 bp) [177], *L. chagasi* (đồng nghĩa với *L. infantum*) (1060 bp) [68], *L. donovani* (1020 bp) [185]. Tuy nhiên, sự khác biệt trong trình tự ETS có thể phân biệt Sauro *Leishmania* với *Leishmania*.

Bộ đệm không phiên mã (NTS)

Một bộ đệm rRNA liên gen dài từ 2 đến 30 Kb. Nó có thể chứa hầu hết các yếu tố quy định cần thiết cho quá trình phiên mã [162].

1.3.3.2. Các gen mã hóa protein

Cấu trúc nhiễm sắc thể khác nhau giữa *Leishmania* và trong các loài. *L. major* là tài liệu tham khảo tối ưu để nghiên cứu những thay đổi của nhiễm sắc thể vì bộ gen của nó được tập hợp bằng cách sử dụng dữ liệu trình tự mao mạch dài. Các thành viên của *Leishmania* sở hữu 36 nhiễm sắc thể, ngoại trừ phức hợp *L. mexicana* có 34 nhiễm sắc thể do sự hợp nhất của chr8 hợp nhất với chr29 thành chr8 duy nhất ở *L. mexicana*, và một sự hợp nhất khác của chr20 với chr36 chr29 ở *L. mexicana* [145]. Phân giống *viannia* có 35 nhiễm sắc thể chr20 dài của chúng tương đồng với chr20 và chr36 ở *L. major* [44]. Phân giống Sauro *Leishmania* có 38 nhiễm sắc thể do sự phân ra của những nhiễm sắc thể tương đồng với chr30 và chr36 trong phân giống *Leishmania*[47].

Bộ gen của *Leishmania* nhỏ gọn với kích thước là 33 Mb [79, 126]. Số lượng gen cao nhất đã được ghi nhận ở *L. tarentolae* (8530), tiếp theo là *L. major* (8400), *L. infantum* hay *L. donovani* (8199), *L. braziliensis* (8175), *L. mexicana* (8106), *L. adleri* (7959) và *L. panamensis* (7748). Tuy nhiên, những giá trị này có xu hướng đại diện cho sự khác biệt trong phương pháp lắp ráp bộ gen, kiểu đọc trình tự và độ dài, và độ phân giải số bản sao gen hơn là sự khác biệt thực sự, ngoại trừ một số họ gen đặc trưng.

Một số gen đã được sử dụng như các kiểm soát nội sinh để khẳng định mức độ biểu hiện của các gen mục tiêu. Chúng bao gồm một số gen đơn hoặc nhiều bản

sao được sử dụng để phát hiện, xác định và phân tích phát sinh loài của các loài *Leishmania* như α -tubulin và β -actin.

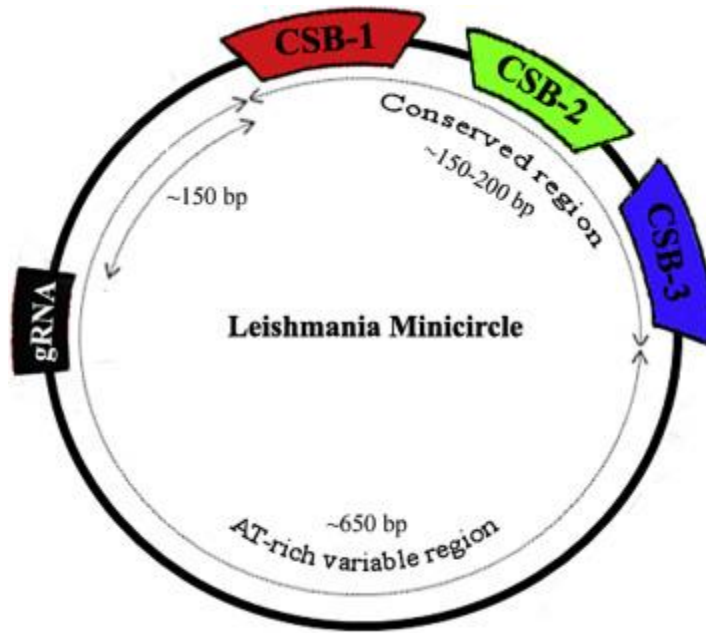
1.3.3.3. ADN ngoài nhiễm sắc thể

ADN Kinetoplast (ADN ty thể)

Tất cả các trùng roi kinetoplastid đều sở hữu một bộ gen ty thể duy nhất được gọi là ADN động bào (kDNA), bao gồm vài nghìn phân tử ADN hình tròn liên kết với nhau trong một mạng lưới nối gồm hàng nghìn minicircles (khoảng 1 kb mỗi vòng) và vài chục maxicircles (xấp xỉ 23 kb mỗi vòng) [106]. Maxicircles mã hóa các gen tương đồng với các gen có trong ADN ty thể của các sinh vật nhân thực khác. Minicircles chiếm khoảng 95% kDNA và mã hóa các phân tử ARN nhỏ được gọi là ARN dẫn đường, cung cấp thông tin cho việc biên tập ARN của các bản sao mã hóa maxicircle [166]. kDNA theo truyền thống là mục tiêu được sử dụng thường xuyên nhất để phát hiện và định loài *Leishmania* vì tính chất đa điểm của nó và cho độ nhạy cao.

kDNA maxicircle

Thành phần kDNA mã hóa các tiểu đơn vị của phức hợp chuỗi hô hấp ty thể, một tiểu đơn vị ribosom và hai rRNA nhỏ bất thường (12S và 9S). Ngược lại với hầu hết các ADN ty thể, kDNA không mã hóa tRNA [32, 107]. Vòng tròn bao gồm vùng bảo tồn mã hóa protein và rRNA và vùng biến đổi không phiên mã (VR). VR bao gồm nhiều chuỗi lặp lại khác nhau với chức năng không xác định và có cấu trúc tương tự ở tất cả các loài *Leishmania*, với các đoạn lặp lại dài giàu GC xen kẽ bởi các đoạn lặp ngắn giàu AT. Maxicircle mã hóa ba khung đọc mở chưa được chỉ định, MURF1, MURF2 và MURF4, có khả năng mã hóa các protein (Hình 12). Các gen maxicircle có các mức độ bảo tồn trình tự khác nhau, từ tiểu đơn vị cytochrome oxidase I (COI) được bảo tồn cao đến COIII ít được bảo tồn nhất, một tiểu đơn vị khác của cùng một phức hợp. Maxicircle kDNA khác biệt giữa *Leishmania* các loài hầu như chỉ có ở VR.



Hình 1.18. kDNA minicircle của các loài Leishmania và các mảnh thành phần của nó. CSB: Khối trình tự bảo tồn [28].

Vùng minicircle được bảo tồn chứa các khối trình tự được bảo tồn (CSB-1, CSB-2 và CSB-3) có chiều dài thay đổi trong cả giống Leishmania [140]. Do đó, chúng là mục tiêu hiệu quả để khuếch đại PCR của tất cả các lớp minicircle. Khu vực được bảo tồn có thể phân biệt Leishmania ở cấp độ phân giống [93]. Vùng biến đổi của các vòng tròn dài khoảng 150 bp và có thể được sử dụng để phân biệt chính xác giữa các loài Leishmania và giữa các chủng [67, 80, 93, 114, 116, 134, 148, 161].

1.3.4. Phương pháp chẩn đoán Leishmania trong phòng thí nghiệm

Các phương pháp chẩn đoán bệnh Leishmaniasis hiện tại chủ yếu được thực hiện ở các bệnh viện hoặc trung tâm nghiên cứu với các phòng thí nghiệm được trang bị tốt. Phần lớn các xét nghiệm được sử dụng rộng rãi chỉ có thể phát hiện một hoặc một vài loài Leishmania và do đó không thích hợp cho các khu vực có nhiều loài. Các phương pháp chẩn đoán khác nhau và khả năng phát hiện, xác định và định lượng các loài Leishmania, cũng như khả năng phân biệt của chúng ở các cấp độ khác nhau (giống, phân giống, loài, phức hợp loài, loài và quần thể) được thể hiện trong bảng 1.1. Trong đó, phương pháp xét nghiệm được chia thành 2 nhóm chính:

- Xét nghiệm dựa vào vật liệu di truyền ADN:
 - + Dựa trên quy trình PCR: Nested PCR, RAPD, RFLP, SNP, MLMT, MLST;
 - + Dựa trên quy trình sau PCR: PCR – ELISA, PCR-RFLP, PCR-HRM, giải trình tự;
 - + Các kỹ thuật khác: PFGE, LAMP...
- Xét nghiệm không dựa vào vật liệu di truyền ADN:
 - + Kỹ thuật ký sinh trùng (Parasitological methods): Kính hiển vi, nuôi cấy invitro, động vật thí nghiệm, cấy dưới da, chẩn đoán véc tơ;
 - + Kỹ thuật huyết thanh học (Serological methods): ELISA, IFAT, Western blot;
 - + Kỹ thuật dựa trên Protein: MLEE, MALDI-TOF.

Các kỹ thuật nhuộm soi, nuôi cấy invitro hay xét nghiệm chẩn đoán ngoài da...không có hiệu quả trong việc phân biệt giữa các phức hợp loài *Leishmania*. Việc xác định và phân biệt các phức hợp loài *Leishmania* có thể được thực hiện thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử khác nhau. Các đoạn khuếch đại từ mẫu có thể được kiểm tra bằng điện di để tìm sự khác biệt về kích thước gen, sự thay đổi vị trí giới hạn bằng cách sử dụng enzym giới hạn, giải trình tự hoặc phân tích đường cong HRM.

Nested PCR và semi-nested PCR là các phiên bản không định lượng của PCR nhằm giảm sự liên kết không đặc hiệu. Hai bộ mồi được sử dụng trong hai lần chạy liên tiếp, trong đó bộ mồi thứ hai khuếch đại sản phẩm PCR vòng 1. Điều này đảm bảo rằng sản phẩm nested PCR có độ đặc hiệu cao [27]. Nested PCR và semi-nested PCR có thể được sử dụng để phân biệt loài với các loại mồi thích hợp.

Bảng 1.2. Bảng tổng hợp các phương pháp xác định và chẩn đoán Leishmania [28].

Phương pháp	Chẩn đoán	Định loài	Định danh						Định lượng	Nuôi cấy	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	Chi phí	Nguồn			
			G	SL	SG	C	S	F									
Chẩn đoán dựa vào ADN	Dựa trên quy trình PCR	PCR Nested	Có	Có	+	+	+	+	+	Có	-	XXX	XX	XX	Noyes et al., 1998[123]		
		RAPD	Ko	Ko						+	Ko	+			XX	Tibayrenc et al., 1993[174]	
		AFLP	Ko	Ko							+	Ko	-	XX	XXX	XX	Kumar et al., 2010[92]
		SNP	Ko	Ko	+	+	+	+	+	+	Ko	-	XXX	XXX	XX	Downing et al., 2012[59]	
		MLMT	Ko	Ko							+	Ko	+	XXX	XXX	XX	Kuhls et al., 2007[89]
	MLST	Ko	Ko	+	+	+	+	+	+	Ko	+	XXX	XXX	XX	Ravel et al., 2006[139]		
	Dựa trên quy trình sau PCR	OC-PCR	Có	Có	+	+	+	+	+		Ko	-	XXX	XX	XX	Basiye et al., 2010[40]	
		PCR-ELISA	Có	Có	+	+	+	+	+		Ko	-	XX	XXX	XX	De Doncker et al., 2005[54]	
		PCR-HRM	Có	Có	+	+	+	+	+	+	Ko	-	XX	XXX	XX	Nasereddin and Jaffe 2010[121]	
		PCR-RFLP	Có	Có	+	+	+	+	+		Ko	-	XX	XXX	XX	Dweik et al., 2007[61]	
Giải trình tự		Có	Có	+	+	+	+	+	+	Ko	-	XXX	XXX	XX	Van Eys et al., 1992[178]		
Các phương pháp khác	PFGE	Ko	Có						+	Ko	+	XX	XX	XX	Beverley, 1988[42]		
	NASBA	Ko	Có							Ko	-	XX	XXX	XX	Basiye et al., 2010[40]		
	LAMP	Ko	Có							Ko	-	XXX	XXX	XX	Ghasemian et al., 2014[69]		
Chẩn đoán không dựa	Kỹ thuật ký sinh trùng (Parasitological methods)	Kính hiển vi	Có	Ko	+					Có	-	XX	X	X	Bensoussan et al., 2006[41]		
		Nuôi cấy invitro	Có	Ko	+					Ko	+	X	X	XX	Castilla et al., 1995[48]		
		Nuôi trên động	Có	Ko	+					Ko	-	X	XX	XX	Gupta, 2011,		

Phương pháp	Chẩn đoán	Định loài	Định danh						Định lượng	Nuôi cấy	Độ nhạy	Độ đặc hiệu	Chi phí	Nguồn
			G	SL	SG	C	S	F						
vào ADN	vật thí nghiệm												Loría-Cervera and Andrade-Narváez, 2014[105, 171]	
	Cây dưới da	Có	Ko	+					Ko	-	XX	XXX	X	Sadeghian et al., 2013[146]
	Chẩn đoán véc tơ	Có	Ko	+					Ko	-	XX	XXX	X	Sadlova et al., 2015[147]
Phương pháp huyết thanh học (Serological methods)	ELISA	Có	Ko	+					Ko	-	XX	XX	X	Sundar and Rai 2002[172],
	IFAT	Có	Có	+					Ko	-	XXX	XX	X	Figueiredo et al., 2010[65]
	ICT	Có	Có	+					Ko	-	XX	XX	X	da Silva et al., 2015[53]
	DAT	Có	Ko	+					Ko	-	XX	XXX	X	Adams et al., 2012[26]
	CIE	Có	Ko	+					Ko	-	X	XX	X	Mancianti & Meciani, 1988[111]
	Western blot	Có	Có	+	+	+	+	+	+	Ko	-	XXX	XXX	X
Phương pháp dựa trên Protein	MLEE	Ko	Có	+	+	+	+	+	Ko	+			X	Rioux et al., 1990[143]
	MALDI-TOF	Ko	Có	+	+	+	+	+	Ko	+			XXX	Lixia et al., 2012[103]

Ghi chú: Ko: không, X: thấp, XX: trung bình, XXX: cao;

G: Genus (Giống), SL: Section level (phân lớp), SG: Subgenus (phân giống), C: Complex (phức loài), S: Species(loài) và F: Foci (chi).

[RAPD](#) (Random amplified polymorphic DNA); [AFLP](#) (Amplified fragment length polymorphism); [SNP](#) (single nucleotide polymorphism); [MLMT](#) (Multilocus [microsatellite](#) typing); [MLST](#) (Multilocus sequence typing); [OC-PCR](#) (Oligochromatography-PCR); [PCR-ELISA](#) (enzyme-linked immunosorbent assay); [PCR-HRM](#) (high-resolution melting); [PCR-RFLP](#) (restriction fragment length polymorphism); [PFGE](#) (pulsed-field gel electrophoresis); [NASBA](#) (nucleic acid sequence based amplification); [LAMP](#) (Loop-mediated isothermal amplification); [ELISA](#) (enzyme-linked immunosorbent assay); [IFAT](#) (indirect fluorescent antibody test); [ICT](#) (immuno-chromatography technology); [DAT](#) (direct agglutination test); [CIE](#) (Counterimmunoelectrophoresis); [MLEE](#) (Multilocus Enzyme Electrophoresis); [MALDI-TOF](#) (Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight)

Multiplex PCR khuếch đại đồng thời của một số đoạn ADN đích khác nhau trong cùng một phản ứng duy nhất để tạo ra các sản phẩm có kích thước khác nhau. Phương pháp này đã được sử dụng để chẩn đoán bệnh Leishmaniasis bằng cách sử dụng các SL ARN [72, 82] và kDNA minicircles [56].

Real-time PCR cho phép định lượng hoặc bán định lượng các sản phẩm ADN được tạo ra bằng cách theo dõi sự khuếch đại của phân tử ADN mục tiêu trong mỗi chu kỳ PCR. Phương pháp này rất quan trọng đối với một số phương pháp điều trị bệnh Leishmaniasis [128].

Giải trình tự gen (Sanger hay NGS – Next Generation Sequencing): Phương pháp Sanger đang được cải thiện nhanh chóng về chất lượng, độ dài đọc, tốc độ, chi phí và nó được sử dụng rộng rãi để nhận dạng của các phức hợp loài *Leishmania* và các nghiên cứu phát sinh loài [46, 149].

Công nghệ giải trình tự thế hệ mới (NGS) trong việc phân tích bộ gen *Leishmania* gần đây đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc khám phá các đa dạng di truyền khác nhau bao gồm đa hình nucleotide đơn (SNPs), các biến thể số bản sao (CNVs), các biến thể cấu trúc một cách chi tiết và cung cấp những hiểu biết có giá trị về sự phức tạp của bộ gen và quy định gen. Việc phân tích bộ gen của *Leishmania* gặp phải một thách thức vì sự hiện diện thường xuyên của thể dị bội. Điều này làm ảnh hưởng đến độ chính xác của việc phát hiện tất cả các biến thể di truyền.

PCR-ELISA là một phương pháp miễn dịch học để phát hiện và định lượng các sản phẩm PCR trực tiếp sau khi cố định ADN được đánh dấu sinh học trên một tấm vi mảnh bằng cách sử dụng ba bước: khuếch đại, cố định và phát hiện. Gen đích được khuếch đại bằng PCR với sự hiện diện của digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP). Các sản phẩm PCR được đánh dấu DIG liên kết với các đầu dò oligonucleotide cụ thể được đánh dấu bằng biotin ở các đầu 5' của chúng để chúng có thể được cố định trên vi tấm và các axit nucleic của chúng có thể được phát hiện. PCR-ELISA nhạy hơn PCR thông thường, có thời gian phân tích ngắn hơn và giới hạn phát hiện thấp hơn nhưng không phân biệt được giữa các loài [54, 169].

PCR-HRM (High Resolution Melting) đo sự thay đổi cường độ huỳnh

quang của thuốc nhuộm xen kẽ ADN trong quá trình phân ly ADN sợi kép (dsDNA) thành ADN sợi đơn (ssDNA). PCR-HRM có thể phát hiện các lựa chọn thay thế dsDNA và phân biệt các loài *Leishmania* khác nhau dựa trên thành phần, chiều dài, hàm lượng GC và tính bổ sung của sợi [75, 121].

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) là một phương pháp phát hiện sự thay đổi giữa các mẫu của đoạn ADN được tạo ra bằng cách phân hủy bằng enzym giới hạn được hiển thị bằng phương pháp điện di trên gel. Các RFLP này được tạo ra bởi các nucleotide thay thế tại các vị trí hạn chế và thường được sử dụng làm điểm đánh dấu trên bản đồ liên kết di truyền. Sự thay đổi chiều dài và sự khác biệt về số lượng, kiểu mẫu của các mảnh có thể được sử dụng để phân biệt các loài *Leishmania* [30, 112], đặc biệt khi áp dụng cho ITS1 [152] và mini-exon [114] hoặc hsp70 [115].

1.3.5. Leishmaniasis và một số đặc điểm dịch tễ

1.3.5.1. Dịch tễ học bệnh Leishmaniasis trên thế giới

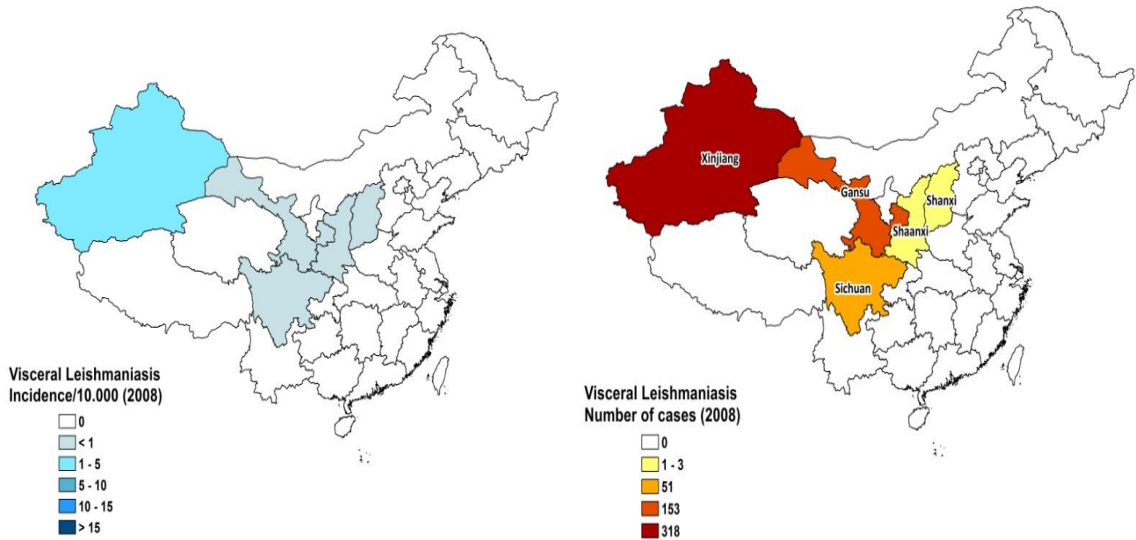
Bệnh Leishmaniasis vẫn là một trong những căn bệnh bị lãng quên trên thế giới trước khi TCYTTG nhấn mạnh việc cần phải kiểm soát bệnh này. Bệnh ảnh hưởng đến phần lớn những người nghèo ở các nước đang phát triển; 350 triệu người được coi là có nguy cơ nhiễm bệnh Leishmaniasis, và khoảng 2 triệu trường hợp mới xảy ra hàng năm [182]. Trong báo cáo về gánh nặng y tế của các bệnh truyền nhiễm và ký sinh trùng trên toàn thế giới, Hotez đã xếp bệnh Leishmaniasis đứng thứ 9 với 2.357.000 ca bệnh hằng năm chủ yếu xảy ra ở Châu Phi, Đông Nam Á, Đông Địa Trung Hải, Tây Thái Bình Dương, Châu Mỹ và Châu Âu trong đó khu vực Đông Nam Á là nặng nề nhất với khoảng 67,3% tổng số ca mắc của toàn thế giới [77].

Đến năm 2010 khoảng 0,2 - 0,4 triệu trường hợp VL và 0,7 - 1,2 triệu trường hợp CL xảy ra mỗi năm. Hơn 90% các trường hợp VL toàn cầu xảy ra ở sáu quốc gia: Ấn Độ, Bangladesh, Sudan, Nam Sudan, Ethiopia và Brazil. Bệnh Leishmaniasis ở đa phân bố rộng rãi hơn, với khoảng 1/3 số trường hợp xảy ra ở mỗi khu vực trong số ba khu vực dịch tễ học, châu Mỹ, lưu vực Địa Trung Hải và Tây Á (từ Trung Đông đến Trung Á). Mười quốc gia có số ca mắc ước tính cao nhất là Afghanistan, Algeria,

Colombia, Brazil, Iran, Syria, Ethiopia, Bắc Sudan, Costa Rica và Peru, cùng chiếm 70 đến 75% tỷ lệ mắc CL ước tính toàn cầu. Dữ liệu về tử vong rất thưa thớt và thường chỉ đại diện cho các trường hợp tử vong tại bệnh viện. TCYTTG năm 2010 ước tính đến năm 2012 có khoảng 20.000 đến 40.000 ca tử vong do bệnh Leishmaniasis mỗi năm [34]. Chính vì những lý do này và dựa vào kiến nghị của Hội đồng Y tế thế giới vào năm 2007, TCYTTG đã triệu tập một Ủy ban chuyên gia về bệnh Leishmaniasis vào tháng 3/2010, sau đó đã ban hành báo cáo kỹ thuật cập nhật đầu tiên về bệnh Leishmaniasis trong hơn 20 năm [182].

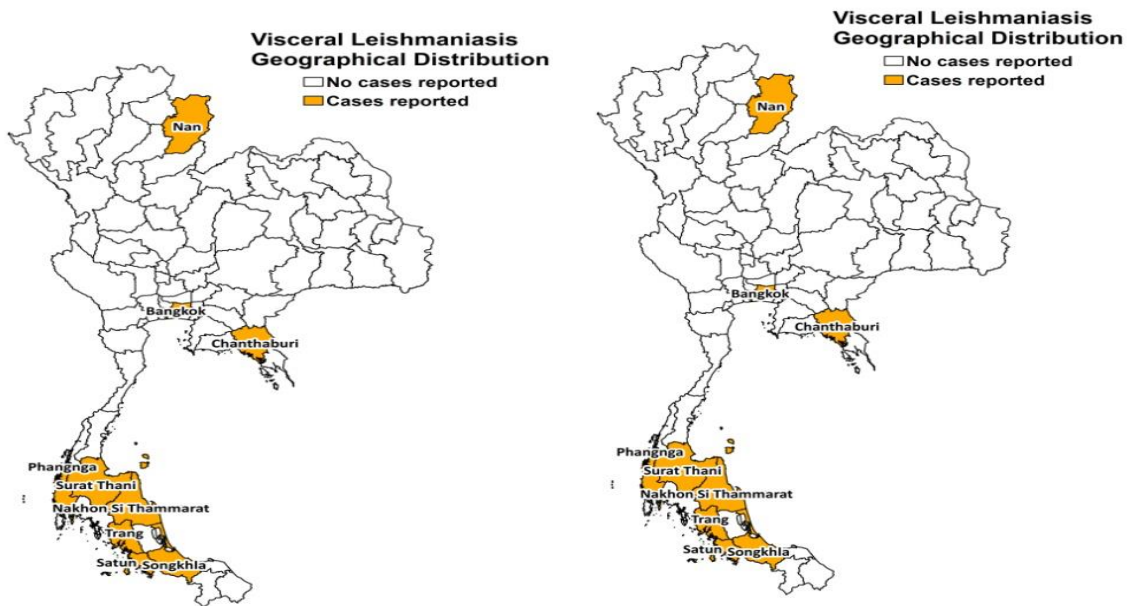
Tỷ lệ mắc kala-azar (thể bệnh VL) trên toàn cầu hàng năm được báo cáo là 58.200 người trong đó 42.619 người xuất phát từ các nước trong lục địa Ấn Độ. Tuy nhiên, số lượng người mắc thực tế có thể cao hơn rất nhiều và số ca mắc kala-azar hàng năm được ước tính trên toàn cầu và Ấn Độ lần lượt là 201.500 – 378.500 VL và 160.000 – 320.000 CL. Các đợt dịch bùng phát tiếp tục xảy ra khiến tỷ lệ tử vong cao, trong đó một đợt bùng phát đang diễn ra ở Nam Sudan. Tại Ấn Độ, số ca kala-azar giảm từ 32.803 ca năm 2005 xuống 24.212 ca năm 2009 (mặc dù số ca mắc bệnh tăng trong năm 2010 lên 28.941 ca và xu hướng có thể tiếp tục tăng trong năm 2011); tỷ lệ tử vong giảm từ 157 người năm 2005 xuống còn 105 người năm 2010 và 66 người năm 2011 [183].

Tại Trung Quốc các báo cáo từ năm 2004 đến năm 2010 ghi nhận 2832 ca bệnh tại 5 tỉnh Tân Cương, Cam Túc, Sơn Tây, Thiểm Tây và Tứ xuyên. Số ca bệnh hàng năm tại Trung Quốc dao động từ 351 - 539 ca/năm với trung bình 405 ca bệnh/năm. Ở Trung Quốc lưu hành cả hai thể bệnh CL và VL, số liệu năm 2008 tại quốc gia này cho thấy 318 ca mắc VL. Các ca mắc CL tại Tân Cương vào khoảng 1 - 5 ca/10.000 dân, 4 tỉnh còn lại ghi nhận ca bệnh CL ở mức dưới 1 ca/10.000 dân. [34] (Hình 1.19).



Hình 1.19. Leishmaniasis được tổng hợp tại Trung Quốc 2004-2010 [34]

Tại Thái Lan trường hợp nhiễm VL đầu tiên báo cáo vào năm 1960, tuy nhiên hệ thống báo cáo hàng năm tại quốc gia này không được duy trì liên tục đến năm 1977 ca bệnh VL tiếp theo mới được ghi nhận. Trong giai đoạn từ 1960 đến 2010 chỉ có 28/50 năm ghi nhận có ca bệnh VL.

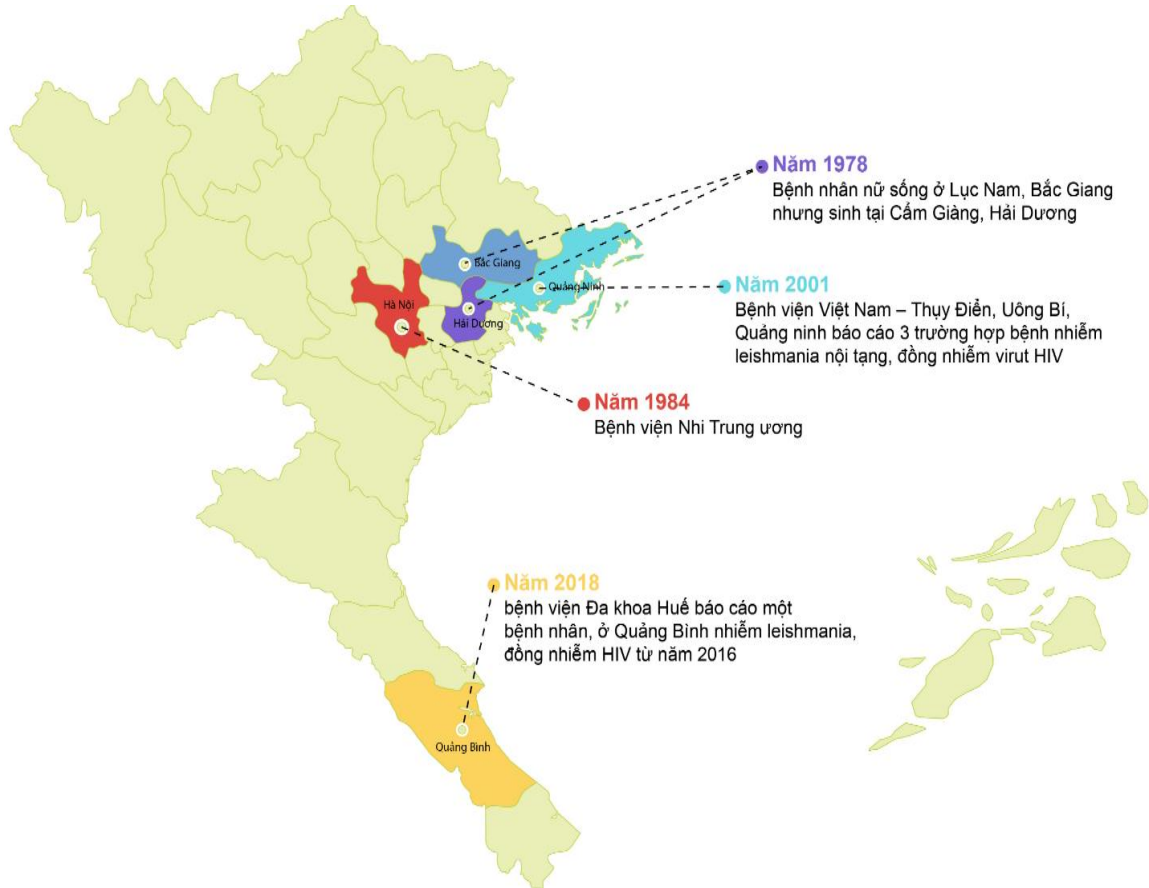


Hình 1.20. Leishmaniasis được tổng hợp tại Thái Lan 2004-2010 [34]

Năm ghi nhận số ca mắc cao nhất của Thái Lan là năm 1987 với 24 ca VL và, tiếp đến là 11 ca bệnh vào năm 1997. Từ năm 1981 - 1986 số ca mắc VL trung bình hàng năm tại Thái Lan là 3,6 ca/năm. Từ năm 2006 - 2010 số ca mắc VL tại Thái Lan trung bình còn 2 ca/năm. [34] (Hình 1.20).

1.3.5.2. Dịch tễ học bệnh *Leishmaniasis* tại Việt Nam

Trường hợp bệnh đầu tiên được báo cáo vào năm 1978, bệnh nhân nữ sống ở Lục Nam, Bắc Giang nhưng sinh tại Cẩm Giàng, Hải Dương đã tử vong ở Bệnh viện Quân y 103 có liên quan đến ký sinh trùng *Leishmania*.



Hình 1.21. Leishmaniasis được báo cáo tại Việt Nam [180]

Trường hợp thứ 2 được ghi nhận vào năm 1984 tại Bệnh viện Nhi Trung ương. Bệnh nhân 6 tuổi, đã tử vong, tìm thấy ký sinh trùng *Leishmania* trong gan, lách, phổi và hệ bạch huyết [12]. Năm 2001, Bệnh viện Việt Nam - Thụy Điển, Ưông Bí, Quảng Ninh báo cáo 3 trường hợp bệnh nhiễm *Leishmania* nội tạng, đồng nhiễm vi rút HIV, kèm theo gan to, lách to, rối loạn tiêu hóa và sốt dai dẳng. Xét nghiệm bằng PCR thấy dương tính với *Leishmania* [6]. Tháng 7/2018, Bệnh viện Đa khoa Huế báo cáo một bệnh nhân, ở Quảng Bình nhiễm *Leishmania*, đồng nhiễm HIV từ năm 2016, bệnh nhân có các triệu chứng sốt cao, suy dinh dưỡng, khó chịu ở bụng, tiêu chảy, viêm phổi, gan và lách to [132] (Hình 1.21).

1.3.6. Đặc điểm lâm sàng, điều trị và phòng ngừa

Theo đặc điểm lâm sàng, có thể chia thành 3 thể bệnh sau:

1.3.6.1. Bệnh *Leishmaniasis* ở da (*CL-cutaneous Leishmaniasis*)

Bệnh *Leishmaniasis* CL cư trú ở da, thời gian ủ bệnh vài tuần đến vài tháng. Triệu chứng ban đầu ngay khi bị tấn công bởi muỗi cát gây các nốt sần; hiếm khi lây lan sang các mạch bạch huyết và các nút bạch huyết. sau khi chữa sẽ để lại sẹo. Tác nhân gây bệnh là nhiễm *L. major* hoặc *L. tropica* [84].

Bệnh *Leishmaniasis* ở da chiếm 50 - 75% các trường hợp mới mắc và là thể nhẹ nhất, ký sinh trùng gây lở loét da. Các vết loét thường phát triển trong một vài tuần hay vài tháng sau khi muỗi cát đốt. Các vết loét có thể thay đổi kích thước và hình dạng theo thời gian, có thể bắt đầu như là sần (da gà) hoặc nốt (cục u) và có thể kết thúc như loét (giống như một ngọn núi lửa, với một cạnh nâng lên và miệng núi lửa trung tâm); loét da có thể được bao phủ bởi một lớp vảy. Các vết loét thường là không đau nhưng một số trường hợp có thể gây đau. Một số người có sưng hạch ở các vết loét (ví dụ, dưới cánh tay nếu vết loét trên cánh tay hoặc bàn tay).

Các biến chứng của CL: liên quan chủ yếu tới các thể DCL, CCL và MCL (ở Tân thế giới). HIV/AIDS và các tình trạng suy giảm miễn dịch khác làm tăng nguy cơ thương tổn niêm mạc và nội tạng, tái phát sau điều trị. Các biến chứng khác là sẹo, biến dạng và những vấn đề tinh thần do kỳ thị xã hội [84].

1.3.6.2. Bệnh *Leishmaniasis* nội tạng (*VL- visceral Leishmaniasis*)

Bệnh *Leishmaniasis* nội tạng cư trú ở cơ quan nội tạng, thời gian ủ bệnh trong hầu hết các trường hợp 3-6 tháng, cũng có trường hợp vài tuần đến vài năm. Các triệu chứng chính sốt, sưng hạch, tăng Ig gamma máu, thiếu máu cấp tính, giảm bạch cầu.

Bệnh *Leishmaniasis* nội tạng làm ảnh hưởng đến nhiều cơ quan nội tạng (thường là lách, gan và tủy xương) và có thể đe dọa tính mạng. Thời gian ủ bệnh và mức bệnh thay đổi. Đặc điểm chính của VL là sốt dao động kéo dài, giảm bạch cầu, thiếu máu, gan to, tăng gammaglobulin trong máu. Các đặc điểm khác bao gồm gầy mòn, “bàn chân cháy” (burning feet) do bệnh lý thần kinh ngoại vi, rối loạn gan, tiêu hóa, chảy máu cam, hạch to. Các thương tổn da xuất hiện sau đó, bao gồm các

dát tăng sắc tố màu tro xám ở thái dương, xung quanh miệng, ở bụng bàn tay, bàn chân ở những người da sáng màu. Vì thế, tên gọi kala-azar (trong tiếng Hindu nghĩa là bệnh đen). Các triệu chứng khác bao gồm giảm sắc tố của lông, tóc và da (ở những bệnh nhân người Kenya), các nodule ở da và loét niêm mạc (ở những bệnh nhân người Sudan), xuất huyết, vàng da.

Nếu không điều trị bệnh nhân sẽ tử vong trong vòng hai năm do biến chứng suy mòn và nhiễm khuẩn thứ phát. Thiếu máu tan máu, tổn thương thận cấp, chảy máu niêm mạc là các triệu chứng ít gặp hơn. Xác định ký sinh trùng trong lách (nhạy nhất), tủy xương ức, hạch lympho, máu, gan, hầu họng hoặc da [84].

1.3.6.3. Bệnh Leishmaniasis ở da và niêm mạc (MCL: mucocutaneous Leishmaniasis)

Bệnh Leishmaniasis ở da và niêm mạc ít phổ biến. Đây có thể là một di chứng của Leishmaniasis: một số loại ký sinh trùng có thể lây lan từ da và gây ra lở loét ở niêm mạc mũi (vị trí phổ biến nhất), miệng hoặc cổ họng. Cách tốt nhất để ngăn chặn Leishmaniasis ở da và niêm mạc là phải điều trị hiệu quả nhiễm trùng da ban đầu [84].

1.3.6.4. Điều trị và phòng ngừa

Điều trị VL thường được thực hiện với các chất thuộc nhóm pentavalent antimonials (meglumin antimonat, natri stibogluconat) pentamidin, hoặc amphotericin B. Tỷ lệ tái phát là tương đối cao, đặc biệt là bệnh nhân HIV. Miltefosine, một ankylophospholipid kháng u mới được phát triển, dùng theo đường uống, đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại VL. Các dạng khác nhau của CL (ví dụ *L. major* và *L. Tropica*) có thể bị ảnh hưởng bằng cách tiêm antimon vào vết tổn thương Leishmaniasis niêm mạc (*L. braziliensis*) được điều trị có hệ thống với antimon (xem ở trên, amphotericin B, hoặc pentamidine). Điều trị hóa trị hiệu quả chưa được nghiên cứu phát triển. Do đó, điều quan trọng là ngăn không cho muỗi hút máu, bằng cách dùng "lưới chống muỗi" mắt nhỏ có tẩm chất diệt côn trùng. Kiểm soát vectơ liên quan đến sử dụng thuốc diệt côn trùng và loại bỏ nơi sinh sản của chúng [182].

CHƯƠNG 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sơ đồ nghiên cứu của 3 mục tiêu



2.1. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 1

○ **Nội dung:** Xác định thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam thu thập năm 2016.

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

Sáu tỉnh được lựa chọn cho nghiên cứu là tỉnh có biên giới với Trung Quốc hoặc trước đây đã ghi nhận có lưu hành của muỗi cát hoặc ghi nhận bệnh nhân nhiễm *Leishmania* bao gồm: Quảng Ninh, Ninh Bình, Lạng Sơn, Lào Cai, Hà Giang và Sơn La. (Hình 3.1)

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu: Muỗi cát (Sand fly), ngành Chân khớp (*Arthropoda*), lớp: Côn trùng (*Insecta*), bộ: Hai cánh (*Diptera*), Họ: *Psychodidae*, Giống: *Phlebotominae*.

2.1.3. Thời gian thu mẫu: Từ tháng 30/5/2016 đến tháng 13/10/2016

2.1.4. Thiết kế nghiên cứu: Điều tra mô tả cắt ngang

2.1.5. Cỡ mẫu

Sử dụng phương pháp chọn mẫu toàn bộ. Tất cả các cá thể muỗi cát được thu thập bằng bẫy đèn tại thực địa đều được đưa vào nghiên cứu.

Các bẫy đèn được đặt trong nhà, xung quanh nhà, sinh cảnh tự nhiên chia theo 6 loại sinh cảnh: Trong nhà, chuồng gia cầm, chuồng gia súc, chuồng lợn, chuồng chó, hang. Thực tế nghiên cứu đã đặt 428 bẫy và ghi nhận 2585 cá thể muỗi cát được thu thập.

2.1.6. Phương pháp thu thập muỗi cát tại các sinh cảnh khác nhau

2.1.6.1. Phương pháp thu mẫu

Sử dụng bẫy đèn CDC (CDC miniature light traps, John W. Hock Co. FL, U.S. A.) để thu thập muỗi cát. Phương pháp bẫy này có ưu điểm là bắt sống và giữ côn trùng trong tình trạng tốt. Bẫy dựa trên sự ưa ánh sáng của côn trùng. Bẫy có một ống hình trụ bằng nhựa, với một hệ thống hút có động cơ nối với một cái quạt nhỏ. Trên quạt có một đèn mờ nhỏ đặt ở giữa một tấm lưới kim loại trong phần trên của ống hình trụ. Tấm lưới ngăn không cho côn trùng lớn vào bẫy. Hệ thống này dẫn dụ côn trùng vào một cái lồng bằng vải tuyền trắng. Hệ thống sử dụng 4

pin/1,5V và phải chạy liên tục cho đến khi thu thập xong. Mỗi điểm đặt từ 2 đến 9 bẫy đèn tùy thuộc vào sinh cảnh (trong nhà, ngoài nhà, khu vực chuồng gia cầm, gia súc, chuồng chó, hang động) trong khoảng thời gian từ 6 giờ chiều ngày hôm trước đến 9 giờ sáng ngày hôm sau. Tổng số có 428 bẫy đèn được đặt tại 116 điểm thu mẫu phân bố ở 6 tỉnh.

2.1.6.2. Phương pháp sàng lọc muỗi cát tại thực địa

- Dụng cụ, trang thiết bị và hoá chất: Bình nitơ lỏng hoặc đá khô, kính lúp hai thị kính, tube 1,5ml, chổi cọ, panh gấp, khay men trắng, ethanol, nước cất khử trùng.

- Các bước thực hiện:

Muỗi thu được tại thực địa được chuyển mẫu nhiệt độ -80°C hoặc $-20^{\circ}\text{C}/20 - 30$ phút để giết các côn trùng thu được. Sau đó, muỗi được đổ ra khay và dùng chổi cọ quét sạch muỗi dính trên túi net. Muỗi cát được sàng lọc dưới kính lúp hai thị kính ở độ phóng đại 60 lần.

Phân biệt muỗi cát với các loại muỗi-côn trùng khác dựa vào các đặc điểm hình thái học đặc trưng sau:

- Muỗi cát: kích thước khoảng 3 - 4 mm, màu vàng nhạt hoặc trắng, trên chân, cánh, thân đều có lông. Muỗi cát có 2 cánh mảnh, cơ thể không có vảy. Cơ thể muỗi cát chia làm 3 phần rõ rệt: đầu, ngực, bụng.

- Phần đầu muỗi cát: vòi theo kiểu chích hút. Đầu muỗi, hơi gù, chực xuống, góc đầu - vòi so với lưng - bụng vào khoảng 75° tương tự muỗi. Vòi ngắn, dài bằng đường kính đầu, ăng ten muỗi cát dài chia thành 16 đốt, đốt đầu tiên ngắn nhất và có hình dạng tròn. Mắt muỗi cát là mắt kép to, đen, nổi bật rõ rệt, kích thước hai mắt bằng khoảng $\frac{1}{2}$ diện tích đầu.

- Chân của muỗi dài và mảnh, gân gấp hai lần chiều dài cơ thể. Cánh muỗi hình bầu dục. Hai cánh của loài muỗi cát không khép áp vào thân mà thường dựng đứng trên thân tạo thành hình chữ V.

- Bụng muỗi có 6 đốt, uốn hơi cong, thon dài và nhỏ dần về phía đuôi, không có vảy sáng trên lưng bụng.

Lưu mẫu: Muỗi đực: cất giữ tube 1,5ml chứa cồn 70%.

Muối cái: cất giữ trong tube 1,5ml trong ni tơ lỏng.

Khi kết thúc toàn bộ chuyến hành trình tại thực địa, mẫu sẽ được chuyển trong bình ni tơ lỏng để vận chuyển về Phòng thí nghiệm Côn trùng, động vật y học, Viện VSDTTU.

2.1.7. Phương pháp làm tiêu bản

Thực hiện tại Khoa Côn trùng và động vật y học - Viện VSDTTU.

- Dụng cụ trang thiết bị và hoá chất sử dụng: Kính lúp điện tử Nikon SMZ745T, giá lạnh, khay ngâm mẫu, tủ sấy mẫu, hộp tiêu bản, lam kính, lamén, kim mổ, pipet, nước cất, potassium hydroxide (KOH), ethanol, acid acetic, chloral hydrat, dầu đinh hương, Euparal.

- Các bước thực hiện:

- Chuẩn bị hóa chất: Pha hóa chất Marc André, dung dịch KOH 10%

Dung dịch Marc André	1x	nx	Dung dịch KOH 10%	1x	nx
Acid acetic (ml)	30	30 x n	Potassium hydroxide (KOH) (g)	10	10 x n
Chloral hydrat (g)	40	40 x n	Nước cất (ml)	100	100 x n
Nước cất (ml)	30	30 x n			

- Pha dung dịch ethanol 70°, 90°
- Chuyển mẫu lên lam kính, đặt lam kính trên giá lạnh và thao tác dưới vi trường của kính lúp điện tử.
- Kiểm tra, ghi nhận thông tin mẫu vào phiếu sau đó điều chỉnh độ phóng đại sao cho nhìn rõ các bộ phận cần thao tác.
- Tách phần đầu muối cát và bộ phận sinh dục, ngâm trong dung dịch KOH 10%/2 giờ, phần ngực bụng chuyển sang tube vô trùng 1,5ml bảo quản -80°C.
- Mẫu được rửa lại bằng nước và ngâm trong nước cất 2 giờ để loại bỏ hết KOH. Chuyển mẫu sang dung dịch Marc André/10 giờ để làm trong mẫu.
- Tiếp tục ngâm mẫu trong nước cất 10 giờ.
- Chuyển mẫu sang dung dịch ethanol 70° trong 20 phút, ethanol 90° trong 20 phút và ethanol 100° trong 20 phút.

- Chuyển mẫu sang dung dịch dầu đinh hương ngâm trong 10 giờ.
- Tiến hành gán lamén bằng Euparal.
- Sấy khô tiêu bản ở nhiệt độ 50°C, có thể lưu giữ tiêu bản trong 3 tháng.

2.1.8. Phương pháp định loại muỗi

Định loại dựa trên theo khóa định loại của Lewis (1978, 1987) và Killick Kendrick và cs. (1991) bổ sung thêm so sánh hình thái, đặc điểm phân đầu, phần phụ sinh dục, túi chứa tinh, hầu, với mô tả của Newstead (1911), Raynal (1936), Abonnenc E. 1972, Johnson H. 1991 và Lewis 1982 [15, 23, 81, 98-100]. Hình ảnh tiêu bản được quan sát bằng hệ thống camera trên kính hiển vi điện tử nilkon E600 và phân tích hình ảnh với phần mềm NIS-Elements. Các hình ảnh kết quả định loài được gửi và khẳng định tại Viện nghiên cứu Montpellier, Cộng hòa Pháp (IRD).

2.1.9. Các chỉ số đầu ra trong nghiên cứu

Độ phong phú: $RA = (\text{Tổng số cá thể loài} / \text{Tổng số cá thể bắt được}) \times 100$

Mật độ: $D = \text{Tổng số cá thể loài} / \text{Tổng số bẫy đặt} / \text{Số ngày đặt bẫy}$

Mức ý nghĩa: $\text{Mean} = \text{Tổng số cá thể thu được} / \text{Tổng số bẫy đặt}$

Số loài: $SR = \text{Số loài ở sinh cảnh thu thập (bao gồm cả } Se. sp2 \text{ và } Se. sp3)$.

2.1.10. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm Stata ver 14 (StataCorp LLC) và Excel. Hình ảnh được chụp và đo đạc bằng phần mềm NIS-Elements. Sử dụng phân tích thống kê Kruskal–Wallis test để so sánh phân bố của muỗi cát theo tỉnh và theo sinh cảnh.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 2

Nội dung: Mô tả thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

2.2.1. Địa điểm nghiên cứu: Khoa Côn trùng và Động vật Y học

2.2.2. Đối tượng nghiên cứu: Các vi rút trong chi *Flavivirus*, họ *Flaviviridae* trong mẫu muỗi cát thu thập tại mục tiêu 1.

2.2.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang có phân tích phòng thí nghiệm

2.2.4. Cỡ mẫu: Toàn bộ mẫu ngực bụng của muỗi cát cái được thu thập: 1009 mẫu.

2.2.5. Sinh phẩm và trang thiết bị

- Sinh phẩm tách chiết ADN/ARN:

- + Proteinase K: Cat No 163048708 – Qiagen
- + β -mercaptoethanol 48,7%: Part No Z523c, Promega
- + Chloroform: isoamyl alcohol (24:1): Cat No C0549-1PT– Sigma
- + 2-propanol: Cat No 1906342500 – Merck
- + Dung dịch CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide):

Dung dịch CTAB	1x	nx
CTAB (g)	10	10 x n
Tris (PH 8.0, 1M) (ml)	50	50 x n
EDTA (PH 8.0, 0.5M) (ml)	20	20 x n
Nước cất (ml)	1000	1000 x n

Sấy khử trùng trước khi sử dụng

-Sinh phẩm PCR:

- + QIAGEN Onestep RT-PCR (Cat No 210212 - Qiagen)
- + Cặp mồi cho phản ứng RT-PCR [78]:

Mồi	Vị trí	Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Nhóm <i>Flavivirus</i>	cFD2 forward	NS5 (9232-9258) GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC	50 μ M
	MAMD reverse	NS5 (9006-9029) AACATGATGGGRAARAGRGARAA	50 μ M

-Chứng chuẩn:

+ Chứng dương (Positive control – POS): DEN 1-4 (PTN Vi rút Arbo, Khoa Vi rút, Viện VSDTTU)

+ Chứng âm (No Template Control - NTC): sử dụng nước cất để kiểm tra quá trình pha sinh phẩm hóa chất

+ Chứng âm tách chiết (Negative Extraction Control – NEC): sử dụng nước cất để kiểm tra quá trình tách chiết

-Trang thiết bị:

Trang thiết bị	Hãng
Phòng thí nghiệm an toàn cấp độ 2	Viện Vệ sinh dịch tễ TW
Buồng cấy an toàn sinh học (Biosafety Cabinet)- Class 2	Bioquell – Anh
Tủ lạnh: 4 ⁰ C, -20 ⁰ C, và -80 ⁰ C	Sanyo – Nhật
Máy ly tâm	Effendorf
Máy luân nhiệt PCR	Biorad
Máy sonicator	Cole-Palmer
Vortex	IKA – Malaysia
Máy soi gel tia UV hãng Gel XL	Gel Mate
Máy chạy điện di nằm	Advance
Cân điện tử	Sartorius
Lò vi sóng 850-1300W	Samsung
Máy chụp gel và phim	UVP
Tủ ấm 33 ⁰ C, 37 ⁰ C	Sanyo
Kính hiển vi lộn ngược	Olympus

- Vật tư tiêu hao:

+ Pipet tự động vi lượng các loại: 0,5 μ l - 1000 μ l

+ Đầu côn vô trùng các loại, có phin lọc: 0,5 μ l - 1000 μ l

+ Pipet đa kênh, pipet có lọc

+ Các vật liệu cần thiết khác như: Găng dùng 1 lần, giấy thấm, găng vải

chống nhiệt...

2.2.6. Xác định/định danh Flavivirus bằng kỹ thuật RT-PCR

*** Tách chiết ADN/ARN**

- Thao tác trên giá tích lạnh, các phần cơ thể của muỗi cát được cho vào ống tube 1,5 ml

- Bổ sung thêm 300 μ l dung dịch CTAB vào mỗi tube, ly tâm nhẹ, quan sát các mảnh mẫu nằm trợn trong dung dịch.

- Bổ sung thêm 10 μ l proteinase K và 0.6 μ l dung dịch β -mercaptoethanol nồng độ 0,2%.

- Thêm vào 4 viên bi nghiền sau đó chuyển vào máy lắc, lắc kỹ 3 lần mỗi lần 2 phút. Kiểm tra lại các mảnh cơ thể muối cát chưa tan hết thì tiến hành lắc lại.

- Ly tâm nhẹ các tube để tránh bọt dính vào nắp và chuyển vào máy ủ ở 60°C trong 2 giờ.

- Chuyển mẫu lên trên giá tích lạnh, bổ sung thêm 300 μ l dung dịch chloroform isoamyl alcohol (24:1), trộn kỹ mẫu bằng máy lắc.

- Ly tâm với tốc độ 14000 rpm trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C

- Nhẹ nhàng lấy mẫu ra khỏi máy ly tâm, dùng pipet chuyển toàn bộ dung dịch nổi sang tube 1.5 ml mới (nếu pipet chạm vào lớp phân tách thì tiến hành ly tâm lại), vất bỏ ống tube cũ.

- Thêm 600 μ l dung dịch isopropanol lạnh.

- Ly tâm với tốc độ 14000 rpm trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C

- Loại bỏ hoàn toàn phần dung dịch.

- Thêm 1 ml ethanol 70% lạnh.

- Ly tâm với tốc độ 14000 rpm trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C

- Đổ bỏ toàn bộ dung dịch, mở nắp tube và để khô.

- Bổ sung thêm 25 μ l nước và để ở nhiệt độ 4°C trong 1 đêm.

- Cất giữ mẫu ở -80 °C.

*** Phản ứng RT-PCR với cặp mồi cFD2-MAMD của Flavivirus [78]**

Sản phẩm sau khi tách chiết thu được ARN, sẽ được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR. Lượng hỗn dịch sinh phẩm và mẫu ARN cần cho một phản ứng và sẽ được chạy theo chu kỳ nhiệt tương ứng với mỗi loại mồi được sử dụng.

Thành phần pha sinh phẩm cho phản ứng RT-PCR

TT	Sinh phẩm	Thể tích (μl)	Số lượng phản ứng (N)
1	Đệm PCR x5	4	4xN
2	Enzym	0.8	0.8xN
3	dNTPs	0.8	0.8xN
4	Mồi xuôi (50 μM)	0.2	0.2xN
5	Mồi ngược (50 μM)	0.2	0.2xN
6	Nước cất tinh sạch	9	9xN
7	ARN mẫu	5	
Tổng số		20	

○ Chu kỳ nhiệt

	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
Flavivirus	50	30:00	x 1
	95	15:00	
	95	0:30	} x 35
	53	0:30	
	72	0:45	
	72	7:00	x 1
	10	∞	

***Nhận định kết quả**

- Kết quả được chấp nhận khi:

- Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế (250 bp).

- Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính.

- Mẫu âm tính với nhóm Flavivirus: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

- Mẫu dương tính với nhóm Flavivirus: sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước 250 bp.

Những mẫu dương tính với nhóm Flavivirus sẽ được giải trình tự gen Sanger.

2.2.7. Giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger

Tinh sạch sản phẩm PCR

Sử dụng sinh phẩm: ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent

Quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất

- Sinh phẩm được giữ tại -30°C . Bỏ sinh phẩm ra ngoài tủ âm và giữ trên đá lạnh trong suốt quá trình sử dụng.

- Trộn $5\mu\text{l}$ sản phẩm PCR với $2\mu\text{l}$ ExoSAP. Tổng thể tích phản ứng là $7\mu\text{l}$. Ủ hỗn hợp phản ứng tại 37°C trong 15 phút để hủy primers và nucleotide còn lại trong phản ứng. Ủ hỗn dịch tại -80°C trong 15 phút để bất hoạt sinh phẩm ExoSap. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được lưu giữ tại -30°C

Tổng hợp sản phẩm PCR để giải trình tự gen (phản ứng PCR sequencing)

Phản ứng PCR giải trình tự được thực hiện với bộ sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. Big Dye Terminator pha loãng theo tỷ lệ 1:3 với dung dịch đệm Big Dye buffer. Thành phần của phản ứng PCR cho kỹ thuật sequencing được sử dụng như sau:

Thành phần của phản ứng	Thể tích cho một môi
Big Dye Terminator (1:3)	$2\mu\text{l}$
Nước không ion	$5\mu\text{l}$
Môi*($3,2\ \mu\text{M}$)	$0,2\mu\text{l}$
5x Sequencing Buffer	$1\mu\text{l}$
ADN khuôn	$2\mu\text{l}$
Tổng số	$15\mu\text{l}$

* Mỗi phản ứng cho một loại môi tương ứng là *cFD2* và *MAMD*

Chu trình nhiệt phản ứng PCR giải trình tự:

Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Thời gian	Chu kỳ lặp
96	1 phút	1
96	10 giây	} 25 chu kỳ
50	5 giây	
60	4 phút	
72	10 phút	1
4	∞	

Tinh sạch sản phẩm PCR giải trình tự gen

Mục đích: loại bỏ các Bigdye terminators còn dư và các thành phần dư khác trong dung dịch đệm (buffers) trước khi tiến hành điện di mao quản nhằm thu được tín hiệu tốt hơn trên máy giải trình tự tự động.

Phương pháp: Sản phẩm PCR giải trình tự gen được tinh sạch bằng bộ kit Dye Ex 2.0 Spin như sau:

- Ly tâm cột Dye Ex ở 3000 vòng/phút trong 3 phút
- Chuyển cột sang tube 1.5ml
- Nhổ mẫu lên gel bed
- Ly tâm ở 3000 vòng/phút trong 3 phút. Loại bỏ cột
- Thu mẫu: dung dịch thu được sau khi ly tâm cột.

Chạy máy giải trình tự ABI 3100-Avant™ Genetic Analyser

Thực hiện giải trình tự trên máy giải trình tự ABI 3100-Avant™ Genetic Analyser (Applied Biosystem, Mỹ) với gel POP-7. Phần mềm ABI PRISM® Gene Scan® Analysis phiên bản 3.7. Trình tự nucleotide được phân tích theo các thông số của phần mềm đi kèm theo máy

- Chuyển toàn bộ dung dịch sản phẩm ADN của phản ứng PCR giải trình tự gen vào từng giếng tương ứng trên đĩa chạy mẫu (sample plate).
- Đặt đĩa vào máy giải trình tự ABI 3100.
- Khởi động phần mềm ABI PRISM® Gene Scan® Analysis phiên bản 3.7.
- Hiệu chỉnh các thông số theo phần mềm trên và cài đặt các thông số cho phân tích kết quả giải trình tự (Pop7, capillary 50, sequencing v3.standard).

2.2.8. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm Stata ver 14 và Excel. Phân tích trình tự gen bằng chức năng BLAST trên NCBI, định danh trên Web Flavivirus Genotyping Tool Version 0.0.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU MỤC TIÊU 3

Nội dung: Mô tả thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu.

2.3.1. Địa điểm nghiên cứu: Khoa Côn trùng và Động vật Y học - Khoa Vi rút – Viện VSDTTU.

2.3.2. Đối tượng nghiên cứu: Các ký sinh trùng *Leishmania* trên muỗi cát cái thu thập trong mục tiêu 1.

2.3.3. Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang có phân tích phòng thí nghiệm

2.3.4. Cỡ mẫu: Toàn bộ mẫu ngực bụng của muỗi cát cái được thu thập: 1009 mẫu.

2.3.5. Sinh phẩm và trang thiết bị

- Sinh phẩm tách chiết ADN/ARN: tương tự mục 2.2.5
- Sinh phẩm Nested PCR:
 - + GoTaq (Cat No M7123, Promega)
 - + Cặp mồi cho phản ứng Nested-PCR [123]

Môi leishmania	Vị trí	Trình tự (5'-3')	Nồng độ
Nhóm Leishmania PCR 1	CBS2XF	kDNA CGAGTAGCAGAACTCCCGTTCA	10 μ M
	CBS1XR	kDNA ATTTTTCGCGATTTTCGCAGAACG	10 μ M
Nhóm Leishmania PCR 2	LIR	kDNA TCGCAGAACGCCCT	10 μ M
	13Z	kDNA TCGCAGAACGCCCT	10 μ M

-Chứng chuẩn:

+ Chứng dương (Positive control – POS): *Leishmania infantum* 680 bp.

+ Chứng âm (No Template Control - NTC): sử dụng nước không chứa DNase-RNase để kiểm tra quá trình pha sinh phẩm hóa chất

+ Chứng âm tách chiết (Negative Extraction Control – NEC): sử dụng nước không chứa Dnase-Rnase để kiểm tra quá trình tách chiết

- Trang thiết bị: tương tự mục 2.2.5.

2.3.6. Phản ứng Nested PCR

Pha sinh phẩm cho phản ứng Nested-PCR: theo hướng dẫn của bộ sinh phẩm Gotaq (Promega).

TT	Sinh phẩm	Thể tích (μ l)	Số lượng phản ứng (N)
1	Đệm Gotap PCR x2	12,5	12.5xN

2	Mồi xuôi	1.5	1.5xN
3	Mồi ngược	1.5	1.5xN
4	Nước cất tinh sạch	4.5	4.5xN
5	DNA mẫu	5	
Tổng số		25	

• Chu trình nhiệt cho nhóm leishmania

PCR 1 với cặp mồi CBS2XF-CBS1X			PCR 2 với cặp mồi LIR-13Z		
Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ lặp
94	2:00		94	2:00	
94	0:30		94	0:30	
54	0:30	} x 35	56	0:30	} x 35
72	1:00		72	1:00	
72	10:00	x 1	72	10:00	x 1
12	∞		12	∞	

• Nhận định kết quả

- Kết quả được chấp nhận khi:

+ Chứng dương: có băng đặc hiệu tương đương với kích thước của cặp mồi thiết kế 680 bp.

+ Chứng âm phản ứng (NTC), chứng âm tách chiết (NEC): âm tính.

- Mẫu âm tính với nhóm Leishmania: sự xuất hiện sản phẩm PCR ở các vị trí không đặc hiệu hoặc không có sự hiện diện của sản phẩm PCR.

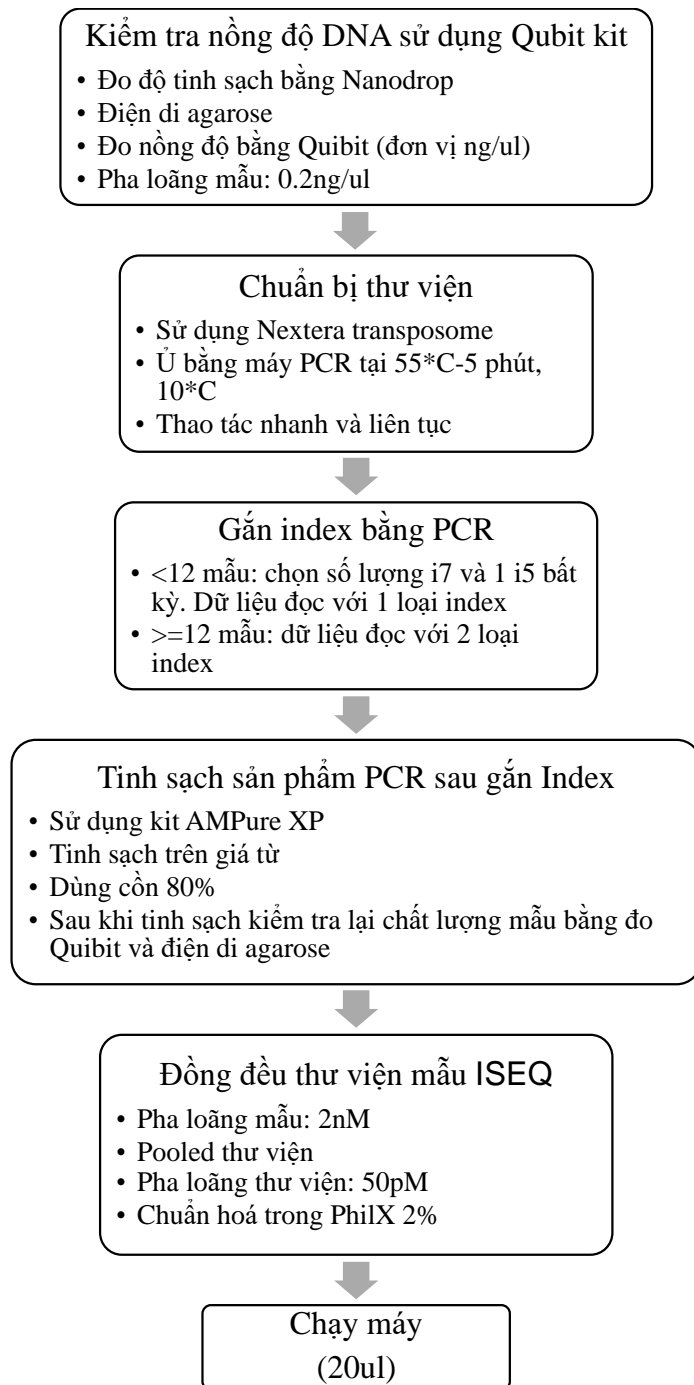
- Mẫu dương tính với nhóm Leishmania: các sản phẩm PCR có kích thước trên 500 bp. Kích thước band tương ứng: *L. amazonensis* MHOM/BR/73/LV78 (517bp); *L. major* MHOM/ET/95/FV1 (560-570 bp); *L. infantum* (680 bp); *L. tropica* (750 bp) [123].

- Những mẫu dương tính bằng Nested-PCR được thực hiện giải trình tự gen (NGS).

2.3.7. Phương pháp giải trình tự gen NGS (Next generation sequencing)

Giải trình gen những mẫu dương tính với Leishmania bằng phương pháp NGS (Next generation sequencing) với bộ kit Nextera XT DNA Library Prep. Đồng đều thu

viện mẫu bằng máy ISEQ 100 sử dụng phương pháp Standard Normalization – Illumina.



Hình 2.1. Quy trình giải trình tự gen NGS với mẫu dương tính với nhóm *Leishmania*

Bước 1: Kiểm tra nồng độ ADN sử dụng Qubit kit

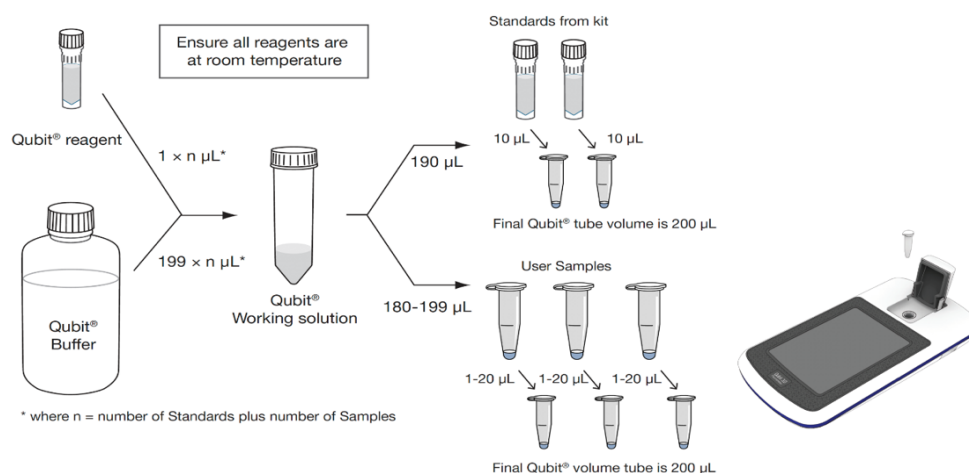
- Chuẩn bị 2 tube cho 2 loại Standard (Qubit dsDNAHS1, HS2), mỗi mẫu cần đo chuẩn bị 1 tube.

- Chuẩn bị Qubit working Solution: pha loãng Qubit reagent theo tỉ lệ 1:200 trong Qubit Buffer. Mỗi mẫu và standard cần chuẩn bị 200 μ l Qubit working solution.

- Mix mẫu đo theo bảng:

Thể tích	Standard Assay tube (ul)	Tube mẫu cần đo (ul)
Qubit working solution	190	197
Standard	10	-
Mẫu	-	3
Tổng thể tích/tube	200	200

- Vortex mỗi tube 2-3 giây
- Khởi động máy đo Qubit, chọn chế độ tương ứng với mục đích đo
- Đo standard 1 và standard 2
- Đo Sample, chọn đơn vị quy đổi ng/ul và chọn thể tích template (2 μ l)
- Đo lần lượt các mẫu, ghi kết quả đo được vào biểu mẫu.



Hình 2.2. Đo nồng độ DNA bằng Qubit

Bước 2: Chuẩn bị thư viện

Gắn Taqment

Chuẩn bị mẫu: Pha loãng mẫu về nồng độ 0,2 ng/ μ l với các mẫu kích thước dưới 2kbp thì có thể chạy tối đa 150 mẫu

- Ước tính số lượng mẫu tối đa có thể chạy cho 1 cardtrige theo kích thước mẫu.

Thể tích	x 1 (μ l)		
TD	10	Trộn 10 lần	55 °C/ 5 phút

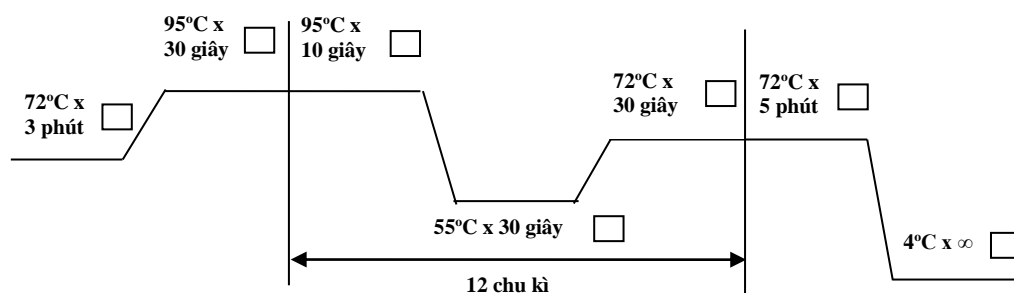
DNA	5		10 °C/ ∞
ATM	5	Trộn 10 lần Spin down	Ngay khi nhiệt độ giảm đến 10 °C cho NT
NT	5		Nhiệt độ phòng 5 phút
Tổng	25		

Gắn index

- Tra 5µl của index i5 và 5µl của index i7 vào mỗi mẫu
- Bỏ sung 15µl NPM vào mỗi mẫu, trộn đều bằng pipet
- Ly tâm ở tốc độ 280g trong 1 phút

Kết thúc bước này tổng thể tích mỗi giếng là 50µl

- Chu kỳ PCR gắn Index



Bước 3: Tinh sạch sản phẩm PCR sau gắn Index

- Vortex AMPure bead, spindown
- Trộn sản phẩm PCR với bead
 - o Nếu DNA đầu vào là DNA tổng số, trộn thể tích sản phẩm PCR và Bead theo tỉ lệ 3:2 (thể tích sản phẩm PCR là 50µl và thể tích Bead là 30µl)
 - o Sản phẩm PCR kích thước nhỏ, xác định tỷ lệ AMPure bead như sau:

Input size (bp)	AMPure XP recommendation ratio	AMPure XP volume (µl) (thể tích PCR = 50µl)
300-500	1.8	90
>500	0.6	30

- Vortex tube chứa sản phẩm PCR có gắn Index và Bead trên máy trong 2 phút, 1800rpm

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Nếu hạt bead bắn lên trên nắp tube thì spin down nhẹ.

- Cho tube lên giá từ và để trong 2 phút hoặc tới khi dung dịch trở nên trong suốt, các hạt từ bám hết lên vị trí tiếp xúc với từ.

- Hút bỏ toàn bộ dịch nổi mà không chạm vào hạt bead. Nếu chạm vào thì trả lại dung dịch, chờ thêm 2 phút nữa trên giá từ để dung dịch trong suốt rồi hút bỏ dịch nổi.

- Rửa 2 lần bằng ethanol 80%

○ Thực hiện trên giá từ

○ Bổ sung 200 μ l ethanol 80%, không mix

○ Ủ trong 30 giây

○ Dùng pipet hút bỏ dịch

- Có thể sử dụng pipet loại nhỏ để hút bỏ hoàn toàn ethanol

- Để tube mở nắp, khô trong nhiệt độ phòng cho đến khi hạt bead se mặt lại (trong khoảng 5-10 phút tùy điều kiện phòng). Tránh để hạt Bead quá ướt (còn EtOH) hoặc quá khô (đứt gãy ADN)

- Đặt mẫu vào khay, bổ sung 52.5 μ l RSB vào mỗi mẫu

- Sử dụng votex, shaking ở 1800rpm trong 2 phút, spindown

- Ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút

- Đặt mẫu lên giá từ, đợi dịch trong (khoảng 2 phút)

- Dùng pipet thu hồi 50 μ l dịch trong chứa ADN đã tinh sạch

- Kiểm tra chất lượng thư viện bằng phương pháp:

○ Đo Qubit: đo nồng độ

○ Điện di agarose: kiểm tra kích thước band

Bước 4: Đồng đều thư viện mẫu

- Dựa vào kết quả đo nồng độ và kết quả chạy điện di là 300bp, đồng đều mẫu về 2 thư viện:

○ Các mẫu 1,6,7,10,11,12,13,14,15,16,17,18 đồng đều về nồng độ 0,2nM

○ Các mẫu 2,3,4,5,8,9,19,20 đồng đều về nồng độ 1nM

- Trộn lẫn thư viện, lấy các thể tích đồng đều 5 μ l mỗi mẫu

- **Pha loãng thư viện tổng** về nồng độ **50pM** trong RSB (pha loãng 40X)

○ Ví dụ: thư viện tổng 50pM = 10 μ l mẫu pool + 390 μ l RSB

○ Thư viện đã pha loãng phải dùng ngay trong ngày

Bước 5: Giải trình tự ISEQ**Hoá chất, sinh phẩm**

	Bảo quản	Sử dụng
Cartridge	-20°C	Rã đông trước khi sử dụng
Flow cell	2°C - 8°C	Để ở nhiệt độ phòng từ 10-15 phút, mở khi sử dụng

- Rã đông cartridge theo 1 trong 3 phương pháp sau, không kết hợp các phương pháp. Không sử dụng cartridge rã đông nhiều lần.

Phương pháp	Thời gian	Hướng dẫn
Tan trong nước 20°C - 25°C	6 giờ, không quá 18 giờ	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sử dụng 6 lít nước để làm tan cartridge ○ Điều chỉnh nước trong bể ổn nhiệt ở 25°C hoặc trộn nước nóng với nước lạnh trong khoảng nhiệt độ 20°C -25°C ○ Để mặt túi đựng cartridge hướng lên trên và ngập trong nước, để vật nặng ~2kg lên trên để ngăn không cho túi nổi lên trên. ○ Không để nhiều túi đựng cartridge cùng tan trong nước, trường hợp này nên làm tan bằng phương pháp nhiệt độ phòng
Trong tủ lạnh 2°C -8°C	36 giờ, không quá 72 giờ	Để túi đựng cartridge trong tủ lạnh, mặt túi hướng lên trên, các mặt xung quang đều có không khí lưu thông kể cả mặt đáy.
Nhiệt độ phòng, 20°C - 25°C	9 giờ, không quá 18 giờ	Để túi đựng cartridge trên bàn trong phòng thí nghiệm, mặt túi hướng lên trên, các mặt xung quang đều có không khí lưu thông kể cả mặt đáy.

Các bước thực hiện

- Load cartridge:
 - Sau khi đã làm tan đông cartridge theo hướng dẫn, mở gói kim loại bọc cartridge. Tránh ánh sáng trực tiếp từ cửa sổ.
 - Trộn đều hoá chất trong khay đựng bằng cách lắc 5 lần.
 - Gõ khay cartridge lên mặt bàn 5 lần (mặt khay hướng lên trên) cho các hoá chất không còn sót trên thành và mặt trên.
 - Dùng đầu tip cắm trực tiếp vào vị trí loading trên cartridge, nhẹ nhàng di

chuyển đầu tip vòng tròn để mở rộng vị trí loading

- Dùng pipet hút 20µl Library loading nhả vào vị trí loading trên cartridge
- Mở gói đựng Flow cell. Sử dụng ngay trong vòng 24 giờ sau khi mở gói.

Chỉ chạm vào phần nhựa của flow cell, tránh chạm vào bề mặt kính, sensor...

- Cầm flow cell nằm ngang, mặt nhãn hướng lên trên, cho vào cartridge.

Thao tác với máy ISEQ xem hướng dẫn sử dụng máy

Bước 6: Phân tích và xử lý số liệu

Dữ liệu sau khi giải trình tự, sử dụng file FastQ để phân tích. Phân tích bằng phần mềm CLC Genomics Workbench 11.0 (Qiagen, Đức). Đây là một phần mềm thương mại có bản quyền dành riêng cho việc phân tích các kết quả giải trình tự gen thế hệ mới.

Các bước tiến hành như sau: Import dữ liệu vào phần mềm, kiểm tra chất lượng trình tự, tiến hành cắt adapter và các nucleotide nhiễu ở hai đầu trình tự, loại bỏ các đoạn chất lượng thấp hoặc quá ngắn, phân tích denovo để tạo các contig, chọn các contig phù hợp blast lên NCBI.

- Import dữ liệu: Trong phần mềm CLC Genomics Workbench, tiến hành import dữ liệu giải trình tự NGS vào. Mỗi mẫu gồm có 2 file fastq đuôi *.R1 và *.R2, tiến hành gộp 2 file read này vào 1 mẫu được một file duy nhất trong phần mềm. Chú ý chọn các tính năng phù hợp với trình tự: phương pháp giải trình tự, đoạn đọc paired reads hay single read...

- Kiểm tra chất lượng trình tự: Các trình tự được kiểm tra chất lượng giải trình tự bằng thao tác Create sequencing QC report. Bước này sẽ giúp đánh giá được chất lượng giải trình tự của từng mẫu.

- Trims: Dựa vào chất lượng giải trình tự, chọn thông số tiến hành chỉnh sửa các reads. Cắt adapter và các nucleotide tín hiệu xấu ở hai đầu trình tự, loại bỏ các đoạn có trình tự ngắn (dưới 20 nucleotide) hoặc nhiều các nucleotide chất lượng thấp.

- Phân tích Denovo: Các reads sau khi được chỉnh sửa sẽ tiến hành phân tích denovo để tạo ra các contig. Tùy thuộc vào mẫu mà số lượng và chiều dài contig sẽ khác nhau.

- Lựa chọn contig: Mỗi mẫu tiến hành sắp xếp các trình tự contig theo thứ tự từ trên xuống dưới. Lựa các trình tự contig có kích thước trên 200 bp của mỗi mẫu để tạo danh sách riêng tiến hành phân tích.

- Blast: Các contig được lựa chọn sẽ được blast lên cơ sở dữ liệu trình tự gen của NCBI để tiến hành so sánh. Dựa vào các kết quả đó để tìm xem có phải tác nhân đang nghiên cứu hay không.

Xây cây phát sinh chủng loại

- Trình tự nhóm Leishmania trên thế giới được lựa chọn làm trình tự tham khảo: Brazil 2012, Senegal 2016, Iran 2019, Bắc Phi 2020. Các trình tự này cùng với các trình tự nhóm Leishmania trong nghiên cứu được sắp xếp, so sánh bằng phần mềm MEGA X.

- Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum likelihood, mô hình GTR+G và bootstrap 1000.

2.3.8. Phân tích bữa ăn máu

Cỡ mẫu: DNA của muỗi cát cái được ghi nhận no máu và dương tính với Leishmania sẽ được dùng để xác định các bữa ăn máu. Việc này nhằm xác định chủng Leishmania này liên quan đến bữa ăn máu của muỗi cát là máu người hay động vật. Tuy nhiên trong nghiên cứu này chúng tôi không tiến hành phân tích bữa ăn máu do các mẫu dương tính với Leishmania trong đề tài đều không ghi nhận có máu.

2.3.9. Nhập liệu và phân tích

Số liệu được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm Stata ver 14 và Excel. Dữ liệu sau khi giải trình tự, sử dụng file FastQ để phân tích.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. THÀNH PHẦN LOÀI VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM PHÂN BỐ CỦA MUỖI CÁT TẠI 6 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM, 2016-2018

3.1.1. Thành phần loài muỗi cát theo giống, mật độ và độ phong phú

Trong năm 2016, bằng bẫy đèn CDC, nghiên cứu đã thu thập được 2585 con muỗi cát, trong đó có 1511 con đực (58,5%) và 1049 con cái (40,6%) với tỉ lệ đực/cái là 1,44. Có 25 mẫu (0,9%) bị hư hại các cơ quan không thể phân biệt đực/cái. Mật độ muỗi cát trong cả đợt thu thập bằng tổng số 428 bẫy trong thời gian 23 đêm là 0,26 con/bẫy/đêm (Bảng 3.1).

Trong 2 năm (2017-2018), 2560 mẫu muỗi cát đã được làm tiêu bản và định loại, trong đó có 127 tiêu bản (4,91%) không được định loại do các bộ phận quan trọng bị phá hủy. 2458/2560 mẫu muỗi cát được định loại đến giống, trong đó 1301 tiêu bản đã được định loại đến loài và 1157 tiêu bản được định loại đến giống hoặc phân giống.

Kết quả định loại cho thấy có 5 giống (genus) muỗi cát: *Sergentomyia* (n=2067, 79,96%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *Phlebotomus* (n=340, 13,15%), *Chinius* (n=31, 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14, 0,54%) và *Grassomyia* (n=6, 0,23%) (Bảng 3.1).

Tổng số 13 loài đã được định danh, trong đó *Sergentomyia* có 7 loài [*Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *brevicaulis* group, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *barraudi* group, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *bailyi*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *hivernus*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *perturbans*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *khawi*]; *Grassomyia* có 1 loài [*Grassomyia indica*]; *Phlebotomus* có 4 loài [*Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*) *stantoni*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *yunshengensis*, *Phlebotomus* (*Larrousius*) *betisi*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *mascomai*] và *Chinius* có 1 loài [*Chinius junlianensis*].

Bảng 3.1. Số lượng, giới tính, mật độ và độ phong phú của muỗi cát theo loài tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016

<i>Loài</i>	Số lượng	Cái/Đực^{*n}	Mật độ	Độ phong phú
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica</i>	249	87/161 (* ¹)	0,0253	9,632
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis</i>	66	49/17	0,0067	2,553
<i>group</i>				
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) barraudi group</i>	324	303/21	0,0329	12,534
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi</i>	55	44/11	0,0056	2,128
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus</i>	49	46/3	0,0050	1,896
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) perturbans</i>	11	5/6	0,0011	0,426
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi</i>	25	7/18	0,0025	0,967
<i>Sergentomyia sp2</i>	201	140/58 (* ³)	0,0204	7,776
<i>Sergentomyia sp3</i>	10	8/2	0,0010	0,387
<i>Sergentomyia und_sp</i>	83	65/18	0,0084	3,211
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.</i>	4	4/0	0,0004	0,155
<i>Sergentomyia sp.</i>	990	50/928 (* ¹²)	0,1006	38,298
<i>Grassomyia indica</i>	6	1/5	0,0006	0,232
<i>Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni</i>	102	46/55 (* ¹)	0,0104	3,946
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis</i>	87	28/59	0,0088	3,366
<i>Phlebotomus (Larrousius) betisi</i>	50	3/47	0,0051	1,934
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai</i>	35	17/18	0,0036	1,354
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.</i>	21	5/16	0,0021	0,812
<i>Phlebotomus (Larrousius) sp.</i>	12	4/8	0,0012	0,464
<i>Phlebotomus sp.</i>	33	25/8	0,0034	1,277
<i>Idiophlebotomus sp.</i>	14	6/8	0,0014	0,542
<i>Chinius junlianensis</i>	31	27/4	0,0031	1,199
Khác (NA)	127	79/40 (* ⁸)	0,0129	4,913
Tổng số	2585	1049/1511 (* ²⁵)	0,2626	100

Khác (NA): số lượng không thể định loài, *ⁿ số lượng không thể phân biệt cái/đực.

• Giống *Sergentomyia*

Sergentomyia xác định được 9 loài, trong đó 7 loài đã được định danh: *Se. barraudi group* và *Se. sylvatica* là 2 loài nhiều nhất với số lượng cá thể thu thập được lần lượt là 324 con và 249 con. Tiếp theo đó là 5 loài với tổng số 206 cá thể: *Se. bailyi* (n=55), *Se. hivernus* (n=49), *Se. brevicaulis* (n=66), *Se. khawi* (n=25), *Se. perturbans* (n=11). Hai loài với tổng số 211 mẫu vật (8,16%), được xác định là *Se. sp2* (n=201) và *Se. sp3* (n=10) có đặc điểm hình thái biểu hiện không tương ứng với các loài hiện có nên nhiều khả năng là các loài mới. *Se. und_sp.* (n=83) là nhóm mẫu vật không đồng nhất nên chúng tôi chưa tách biệt được loài, có thể nhóm này là một vài loài mới chúng tôi cần những dữ liệu bổ sung để khẳng định thêm về nhóm này. Có 4 mẫu vật của muỗi cát cái được xếp vào giống *Sergentomyia* phân giống *Neophlebotomus* tuy nhiên các đặc điểm định loài không rõ nên chúng tôi xếp vào nhóm *Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.*

Có 990 mẫu vật thuộc nhóm *Sergentomyia sp.* là các mẫu vật thuộc giống *Sergentomyia* các đặc điểm tách phân giống hoặc tách loài không rõ ràng. Đa phần trong nhóm này là các con đực *Sergentomyia* (n=928), chiếm tỷ lệ nhiều nhất 80,21% của tổng số các tiêu bản được định loại đến giống hoặc phân giống.

• Giống *Phlebotomus*

Phlebotomus có 4 loài: *Ph. stantoni* (n=102), *Ph. yunshengensis* (n=87), *Ph. betisi* (n=50) và *Ph. mascomai* (n=35).

Có 21 mẫu vật thuộc giống *Phlebotomus* phân giống *Euphlebotomus* nhưng không có đặc điểm định loài rõ ràng nên chúng tôi sắp xếp vào nhóm *Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.* Tương tự như vậy với 12 mẫu vật của nhóm *Phlebotomus (Larrousius) sp.*

Có 33 mẫu vật thuộc nhóm *Phlebotomus sp.* là các mẫu vật thuộc giống *Phlebotomus* các đặc điểm tách phân giống hoặc tách loài không rõ ràng.

• Giống *Grassomyia*, *Idiophlebotomus* và *Chinius*

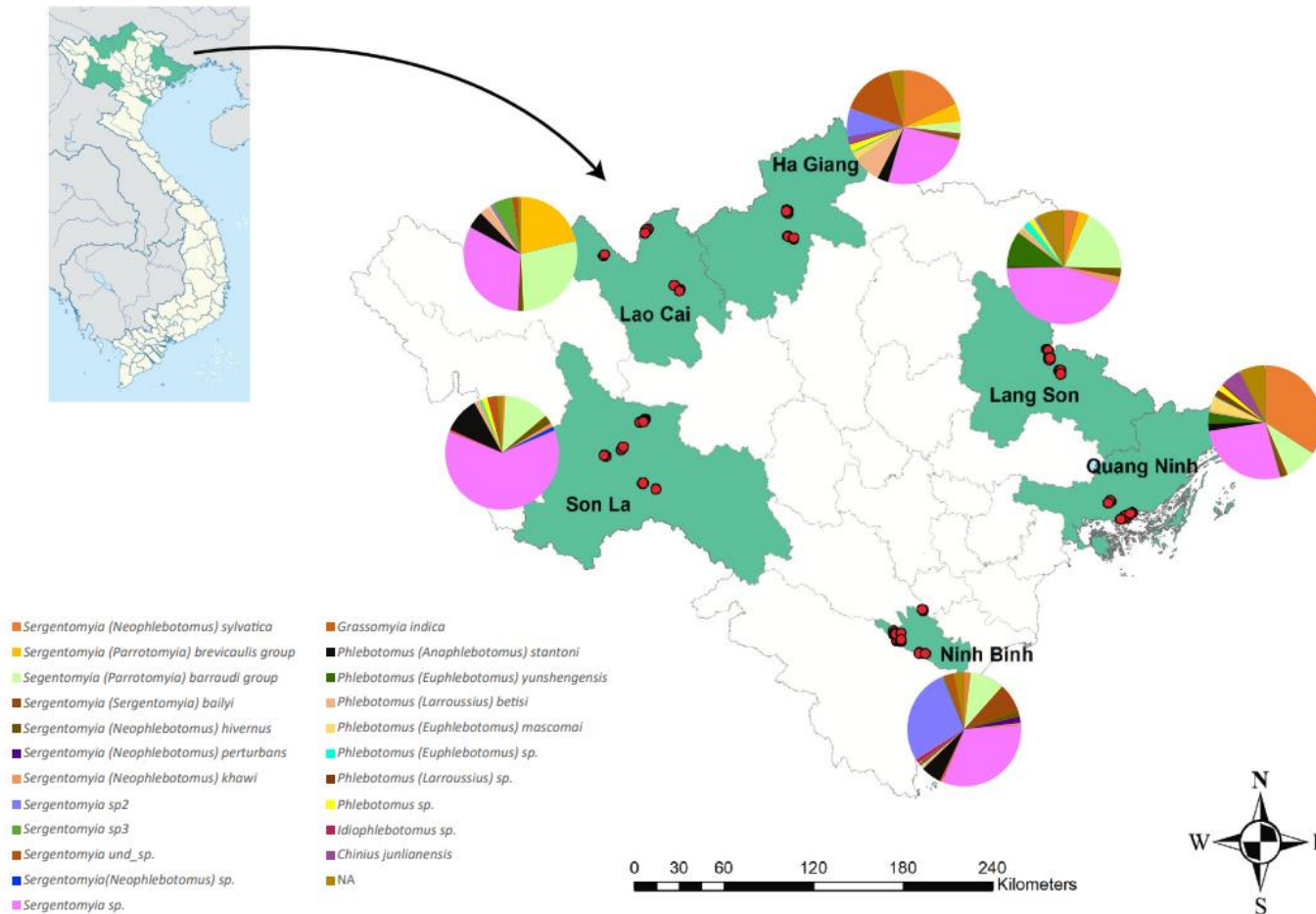
Các giống khác bao gồm 37 mẫu vật, chỉ được đại diện bởi một loài mỗi giống, *Ch. junlianensis* và *Gr. indica* (Bảng 3.1). 14 mẫu vật thuộc *Idiophlebotomus* không thể được xác nhận một cách chắc chắn về cấp loài và được đặt tên là *Idiophlebotomus sp.*

3.1.2. Phân bố muỗi cát theo tỉnh

Toàn bộ các tỉnh trong nghiên cứu đều thu thập được muỗi cát (Bảng 3.2 và hình 3.1). Muỗi cát được thu thập ở tỉnh Quảng Ninh bằng 68 bẫy đèn đặt trong 4 đêm, tại tỉnh Ninh Bình với 85 bẫy đèn trong 4 đêm, tại tỉnh Lạng Sơn sử dụng 76 bẫy đèn đặt trong 4 đêm, tại tỉnh Lào Cai sử dụng 74 bẫy đèn trong 4 đêm, thu tại tỉnh Hà Giang sử dụng 53 bẫy đèn trong 3 đêm và thu tại tỉnh Sơn La sử dụng 72 bẫy đèn trong 4 đêm.

Tại Quảng Ninh, 416 cá thể muỗi cát được thu thập với mật độ muỗi cát là 1,53 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Quảng Ninh}} = 16,09$. Các loài thu thập được là: *Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica* (n=142), *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* (n=39), *Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi* (n=3), *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus* (n=6), *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni* (n=9), *Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis* (n=13), *Phlebotomus (Larroussius) betisi* (n=3), *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* (n=16), *Chinius junlianensis* (n=23). Tại Quảng Ninh, phân bố 9 loài muỗi cát thuộc 4 giống, giống *Sergentomyia* lưu hành chiếm ưu thế (n=302, 72,60%) tiếp đến là giống *Phlebotomus* (n=57, 13,70%), *Chinus* (n=23, 5,53%), *Idiophlebotomus* (n=3, 0,72%), không ghi nhận giống *Grassomyia* tại đây.

Tại Ninh Bình, 612 mẫu được thu thập với mật độ muỗi cát là 1,80 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Ninh Bình}} = 23,68$. Các loài thu thập được là: *Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica*, *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group*, *Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi*, *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus*, *Grassomyia indica*, *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni*, *Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis*, *Phlebotomus (Larroussius) betisi*, *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai*, *Chinius junlianensis*. Tính cả *Se. sp2* và *Se. sp3* thì có tới 12 loài muỗi cát đã được ghi nhận tại Ninh Bình. *Se. und_sp.* (n=18) là các cá thể có đặc điểm hình thái khác biệt, tuy nhiên việc tách chúng ra thành 1 loài mới cần có những phân tích thêm. 4 giống ghi nhận là: *Sergentomyia* (n=534, 87,25%) tiếp đến là giống *Phlebotomus* (n=48, 7,84%), *Grassomyia* (n=4, 0,65%), *Idiophlebotomus* (n=8, 1,31%). Không thấy giống *Chinius* tại đây.



Hình 3.1. Các điểm thu thập và thành phần loài muỗi cát ở 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016

Bảng 3.2. Số lượng muỗi cát, độ phong phú, mật độ và số lượng loài theo tỉnh

<i>Tên loài</i>	Quảng Ninh	Ninh Bình	Lạng Sơn	Lào Cai	Hà Giang	Sơn La
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica</i>	142	11	30		63	3
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group</i>			22	26	18	
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) barraudi group</i>	39	60	132	34	12	47
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi</i>	3	49			3	
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus</i>	6	11	18	2	3	9
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) perturbans</i>		11				
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi</i>		4	16		1	4
<i>Sergentomyia sp2</i>		168	4	1	28	
<i>Sergentomyia sp3</i>		3		7		
<i>Sergentomyia und_sp</i>		18	1	2	54	8
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.</i>						4
<i>Sergentomyia sp.</i>	112	199	326	39	89	225
<i>Grassomyia indica</i>		4				2
<i>Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni</i>	9	36	3	6	11	37
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus)</i> <i>yunshengensis</i>	13		74			
<i>Phlebotomus (Larrousius) betisi</i>	3	1	11	3	27	5
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai</i>	16	4	5	1	8	1
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.</i>	1	2	15		1	2
<i>Phlebotomus (Larrousius) sp.</i>	8	4				
<i>Phlebotomus sp.</i>	7	1	12		7	6
<i>Idiophlebotomus sp.</i>	3	8			1	2
<i>Chinius junlianensis</i>	23		1		7	
NA	31	18	58	1	14	5
Tổng số	416	612	728	122	347	360
Độ phong phú (RA)						13,9
	16,09	23,68	28,16	4,72	13,42	3
Mật độ (D)	1,53	1,80	2,39	0,41	2,18	1,25
Số loài (SR)*	9	12	11	8	11	8

NA: số lượng không thể định loài; * bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*

Tại Lạng Sơn, 728 mẫu vật được thu thập với mật độ muỗi cát là 2,39 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Lạng Sơn}} = 28,16$; 11 loài muỗi cát được ghi nhận trong đó có 10 loài đã được định danh: *Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica* (n=30), *Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group* (n=22), *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* (n=132), *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus* (n=18), *Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi* (n=16), *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni* (n=3), *Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis* (n=74), *Phlebotomus (Larrousius) betisi* (n=11), *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* (n=5), *Chinius junlianensis* (n=1). Một loài đã được xác định nhưng chưa định danh là *Se. sp2* (n=4). Có 1 mẫu *Se. und_sp*. Là cá thể có đặc điểm hình thái khác biệt, tuy nhiên việc tách nó ra thành 1 loài mới cần có những phân tích thêm. Có 3 giống muỗi cát là *Sergentomyia* (n=549; 75,41%) tiếp đến là giống *Phlebotomus* (n=120; 16,48%), *Chinius* (n=1; 0,14%), không ghi nhận giống *Grassomyia* và *Idiophlebotomus*.

Tại Lào Cai, 122 mẫu vật được thu thập với mật độ là 0,41 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Lào Cai}} = 4,72$, 8 loài muỗi cát trong đó 6 loài được định danh *Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group* (n=26), *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* (n=34), *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus* (n=2), *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni* (n=6), *Phlebotomus (Larrousius) betisi* (n=3), *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* (n=1) và 2 loài đang đợi định danh là *Se. sp2* (n=1) và *Se. sp3* (n=7). 2 mẫu vật được ghi là *Se. und_sp* có nhiều đặc điểm hình thái khác lạ, tuy nhiên chưa đủ dữ liệu để xếp chúng vào các loài cụ thể. Chỉ có 2 giống *Sergentomyia* (n=111; 95,90%) và *Phlebotomus* (n=10; 8,20%) xuất hiện tại Lào Cai.

Tại Hà Giang, 347 mẫu vật được thu thập mật độ muỗi cát là 2,18 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Hà Giang}} = 13,42$; 11 loài muỗi cát được thu thập trong đó 10 loài đã được định danh là *Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica* (n=63), *Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group* (n=18), *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* (n=12), *Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi* (n=3), *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus* (n=3), *Sergentomyia (Neophlebotomus)*

khawi (n=1), *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni* (n=11), *Phlebotomus (Larroussius) betisi* (n=27), *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* (n=8), *Chinius junlianensis* (n=7). Một loài mới được ghi nhận chờ đặt tên là *Se. sp2* (n=28), có 54 mẫu *Se. und_sp*. Có đặc điểm hình thái khác biệt cần có những phân tích thêm. 4 giống ghi nhận là: *Sergentomyia* (n=271; 78,10%) tiếp đến là giống *Phlebotomus* (n=54; 15,56%), *Chinus* (n=7; 2,02%), *Idiophlebotomus* (n=1; 0,29%).

Tại Sơn La, 360 mẫu vật đã được thu thập, mật độ muỗi cát là 1,25 con/bẫy/ngày và độ phong phú $RA_{\text{Sơn La}}=13,93$; 8 loài muỗi cát được định danh: *Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica* (n=3), *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* (n=47), *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus* (n=9), *Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi* (n=4), *Grassomyia indica* (n=2), *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni* (n=37), *Phlebotomus (Larroussius) betisi* (n=5), *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* (n=1). 8 mẫu vật được ghi là *Se. und_sp* có nhiều đặc điểm hình thái khác lạ, tuy nhiên chưa đủ dữ liệu để xếp chúng vào các loài cụ thể. Có 4 giống được ghi nhận là: *Sergentomyia* (n=300, 83,33%) tiếp đến là giống *Phlebotomus* (n=51, 14,17%), *Grassomyia* (n=2, 0,56%), *Idiophlebotomus* (n=2, 0,56%).

Giống *Sergentomyia* chiếm ưu thế nhất trong 6 tỉnh, tiếp theo là giống *Phlebotomus*. Phân tích thống kê cho thấy sự phân bố theo giống giữa các tỉnh không có sự khác biệt đáng kể. Nhưng việc phân bố theo loài, bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*, thì rất khác biệt giữa các tỉnh (p-value =0.002, $\alpha=0.05$). Các loài *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group*, *Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus*, *Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni*, *Phlebotomus (Larroussius) betisi*, *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* đều có mặt tại 6 tỉnh, trong khi *Se. bailyi* và *Se. sp2* chủ yếu được phát hiện ở tỉnh Ninh Bình, *Se. barraudi group* ở Lạng Sơn và *Se. sylvatica* tại Quảng Ninh. Mức độ phong phú loài cao nhất (SR = 12) được quan sát thấy ở Ninh Bình, trong khi mức độ phong phú và mật độ tương đối cao nhất được phát hiện ở Lạng Sơn (RA = 28,16; D = 2,39).

3.1.3. Phân bố muỗi cát theo sinh cảnh đặt bẫy

Trong nghiên cứu, 428 lượt đặt bẫy đèn CDC, đặt ở 7 loại sinh cảnh gồm trong nhà, ngoài nhà, trong chuồng gia súc, gia cầm, chuồng lợn, chuồng chó và hang động.

Bảng 3.3. Số lượng muỗi cát, độ phong phú, mật độ và số lượng loài theo sinh cảnh

Tên loài	Chuồng gia súc	Hang	Chuồng gia cầm	Chuồng chó	Trong nhà	Ngoài nhà	Chuồng lợn
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sylvatica</i>	1	141	14	1		92	
<i>Sergentomyia (Parrotomyia) brevicaulis group</i>		45				21	
<i>Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group</i>	4	172	4		1	138	5
<i>Sergentomyia (Sergentomyia) bailyi</i>	15	10	5		3	17	5
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) hivernus</i>	3	10	5	1		28	2
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) perturbans</i>		6			1	4	
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) khawi</i>	3	16			1	5	
<i>Sergentomyia sp2</i>	5	135	2		3	55	1
<i>Sergentomyia sp3</i>		9				1	
<i>Sergentomyia und_sp</i>		20	1		2	60	
<i>Sergentomyia (Neophlebotomus) sp.</i>		4					
<i>Sergentomyia sp.</i>	12	566	12	2	6	378	14
<i>Grassomyia indica</i>		4				2	
<i>Phlebotomus (Anaphlebotomus) stantoni</i>	11	32	8	7	11	24	9
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) yunshengensis</i>		80		1		6	
<i>Phlebotomus (Larrousius) betisi</i>		19	1			30	
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai</i>	2	24		1		8	
<i>Phlebotomus (Euphlebotomus) sp.</i>		14	2			4	1
<i>Phlebotomus (Larrousius) sp.</i>		10	1	1			
<i>Phlebotomus sp.</i>	3	15	2	1		11	1
<i>Idiophlebotomus sp.</i>		7				7	
<i>Chinius junlianensis</i>	1	24				6	
NA	5	68	9	1	2	39	3
Tổng	65	1431	66	16	30	936	41
Độ phong phú (RA)	2,51	55,36	2,55	0,62	1,16	36,21	1,59
Mật độ (D)	0,12	0,79	0,10	0,36	0,08	0,23	0,07
Mức ý nghĩa (Mean)	1,44	15,66	1,57	1,78	1,07	5,29	1,14
Số loài (SR)*	9	15	7	5	6	15	5

NA: số lượng không thể định loài; * bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*

Tại chuồng gia súc: tổng số bắt được là 65 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{chuồng gia súc}} = 2,51$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{chuồng gia súc}} = 0,12$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{chuồng gia súc}} = 1,44$ con/bẫy. Tổng số có 9 loài được thu thập của 3 giống muỗi cát.

Tại sinh cảnh hang đá: tổng số bắt được là 1431 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{hang}} = 55,36$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{hang}} = 0,79$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{hang}} = 15,66$ con/bẫy. Tổng số có 15 loài được thu thập của cả 5 giống muỗi cát.

Tại chuồng gia cầm: tổng số bắt được là 66 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{chuồng gia cầm}} = 2,55$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{chuồng gia cầm}} = 0,10$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{chuồng gia cầm}} = 1,57$ con/bẫy. Tổng số có 7 loài được thu thập của 2 giống muỗi cát.

Tại chuồng chó: tổng số bắt được là 16 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{chuồng chó}} = 0,62$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{chuồng chó}} = 0,36$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{chuồng chó}} = 1,78$ con/bẫy. Tổng số có 5 loài được thu thập của 2 giống muỗi cát.

Ở trong nhà: tổng số bắt được là 30 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{trong nhà}} = 1,16$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{trong nhà}} = 0,08$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{trong nhà}} = 1,07$ con/bẫy. Tổng số có 6 loài được thu thập của 2 giống muỗi cát.

Ở ngoài nhà: tổng số bắt được là 936 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{ngoài nhà}} = 36,21$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{ngoài nhà}} = 0,23$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{ngoài nhà}} = 5,29$ con/bẫy. Tổng số có 15 loài được thu thập của cả 5 giống muỗi cát.

Tại chuồng lợn: tổng số bắt được là 41 con muỗi cát, độ phong phú tương đối $RA_{\text{chuồng lợn}} = 1,59$; mật độ muỗi cát là $D_{\text{chuồng lợn}} = 0,07$ con/bẫy/ngày với mức ý nghĩa $M_{\text{chuồng lợn}} = 1,14$ con/bẫy. Tổng số có 5 loài được thu thập của 2 giống muỗi cát.

Như vậy, muỗi cát được thu thập nhiều nhất trong các hang động ($n = 1431$, độ phong phú tương đối $RA = 55,36$ và $D_{\text{hang}} = 0,79$). Độ phong phú loài cao nhất là ở hang ($SR_{\text{hang}} = 15$, bao gồm cả *Se. Sp2* và *Se. Sp3*). Về mức độ phong phú tương đối, chúng tôi cũng đã thu thập được nhiều muỗi cát ngoài nhà, với 936 mẫu vật tương ứng với $RA = 36,21$ và độ phong phú của loài $SR = 15$ (bao gồm cả *Se. Sp2* và *Se. Sp3*). Tuy nhiên, mật độ muỗi cát được thu thập bằng các bẫy đặt trong chuồng nuôi chó cao hơn so với đặt ngoài nhà ($D_{\text{chuồng chó}} = 0,36$, $D_{\text{ngoài nhà}} = 0,23$). Mật độ muỗi cát trong nhà thấp và tương tự với mật độ trong chuồng gà/gia cầm/vịt và thấp

hơn mật độ trong chuồng nuôi nhốt gia súc trâu/bò/dê ($D_{\text{trong nhà}} = 0,08$; $D_{\text{chuồng gia cầm}} = 0,10$; $D_{\text{chuồng gia súc}} = 0,12$). Sự phân bố này theo sinh cảnh là không khác biệt đáng kể giữa 6 tỉnh.

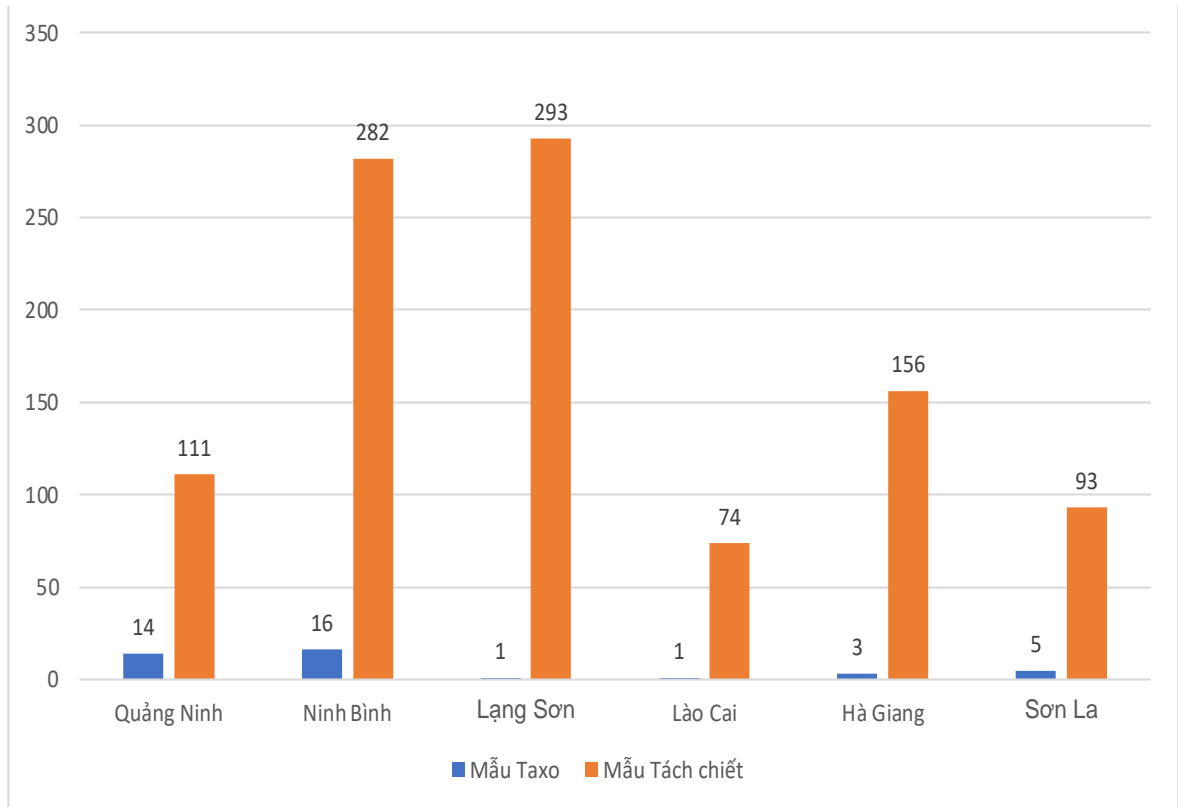
Trong các hang động số lượng loài là nhiều nhất, tất cả các giống và loài đã được tìm thấy (Bảng 3.3 và hình 3.1). Tuy nhiên, giống *Sergentomyia* là đại diện nhất, tiếp theo là giống *Phlebotomus*. Trong chuồng chó và trong nhà, loài muỗi cát được thu thập nhiều nhất là *Ph. stantoni* ($n_{\text{chuồng chó}} = 7$ và $n_{\text{trong nhà}} = 11$). Điều đáng chú ý là *Se. sp2*, *Se. sp3* và *Se. und_sp*. Chủ yếu được phát hiện trong hang động và ngoài trời. Các phân tích thống kê cho thấy sự phân bố của các loài là khác nhau tùy theo sinh cảnh ($p\text{-value} < 0,01$, $\alpha = 0,01$).

3.1.4. Phân bố muỗi cát cái tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam, 2016

Nghiên cứu thực hiện việc sàng lọc tác nhân trên các cá thể muỗi cát cái. Trong tổng số 2585 mẫu muỗi cát thu thập đã xác định được 1049 muỗi cát cái (Bảng 3.1). Trong đó, 40/1049 (3,81%) muỗi cát cái có những đặc điểm hình thái đẹp, đầy đủ các bộ phận được chọn làm tiêu bản toàn thân (mẫu Taxo) nên không tách chiết ADN/ARN trên các cá thể này. Số mẫu còn lại 1009/1049 muỗi cát cái được mổ và chia ra làm 2 loại mẫu: phần đầu và bộ phận sinh dục được tiến hành làm tiêu bản, phần lưng ngực và phần trên của bụng được tách chiết ADN/ARN tổng số để sàng lọc *Leishmania* và *Flavivirus*.

Muỗi cát cái được thu thập tại 6/6 tỉnh trong nghiên cứu. Số lượng muỗi cát cái thu thập được nhiều nhất tại Ninh Bình và Lạng Sơn với số lượng 298 cá thể (28,41%) và 294 cá thể (28,03%), tiếp đến là Hà Giang 159 cá thể (15,16%), Quảng Ninh 125 cá thể (11,92%), Sơn La với 98 cá thể (9,34%) và Lào Cai 75 cá thể (7,15%) (Hình 3.2).

Mẫu được thu thập làm tiêu bản toàn thân (mẫu Taxo) được đại diện cho cả 6 tỉnh, với số mẫu được làm tiêu bản nhiều nhất là Ninh Bình ($n=16$), Quảng Ninh ($n=14$), Sơn La ($n=5$), Hà Giang ($n=3$), Lào Cai và Lạng Sơn mỗi tỉnh có 1 mẫu làm tiêu bản đại diện.

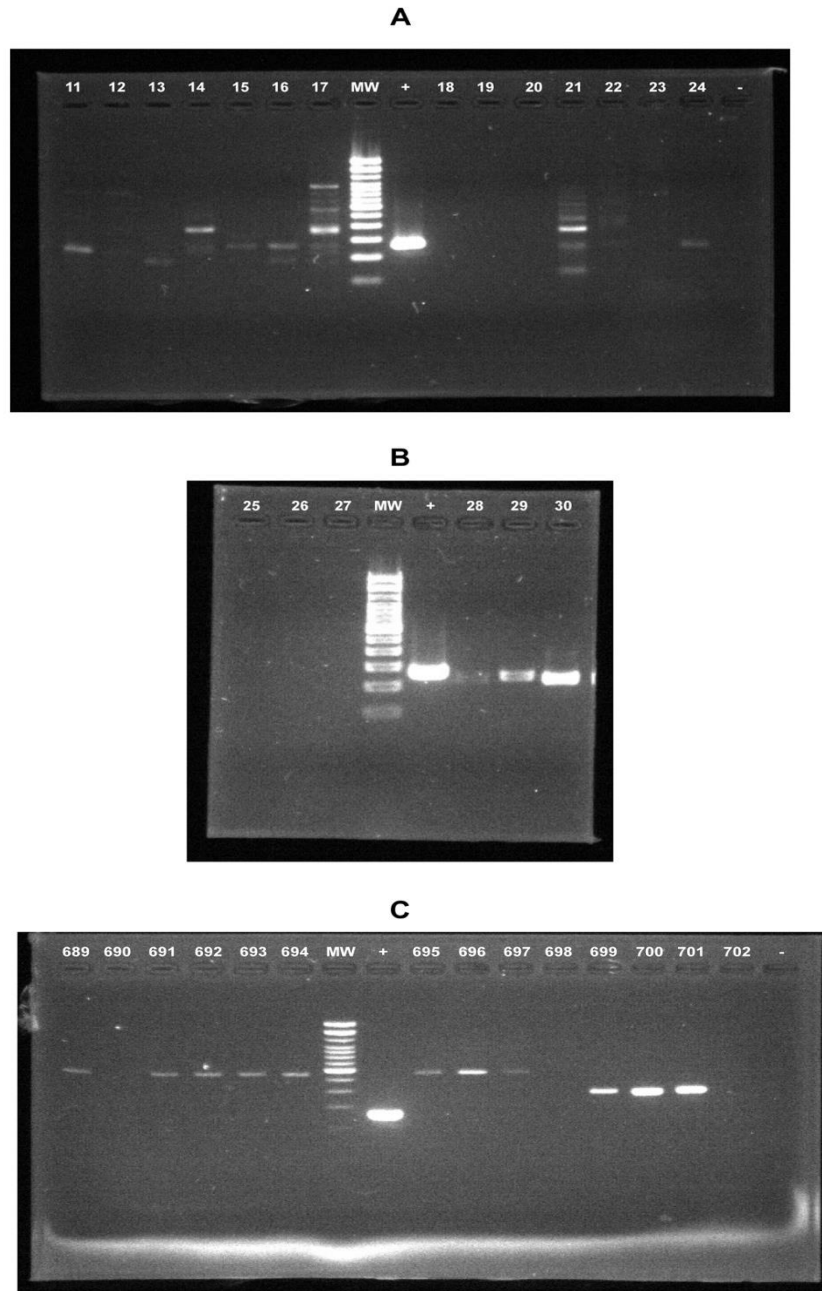


Hình 3.2. Sự phân bố muối cát cái tại 6 tỉnh nghiên cứu, 2016

3.2. THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS Ở MUỐI CÁT TẠI ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

3.2.1 Sàng lọc Flavivirus trên muối cát cái

Nghiên cứu sử dụng cặp mồi cFD2/MAMD trên gen NS5 để xác định vi rút thuộc nhóm Flavivirus trên muối cát cái theo Scaramozzino (2001) và thường quy chuẩn PTN Vi rút Arbo – Viện VSDTTU.



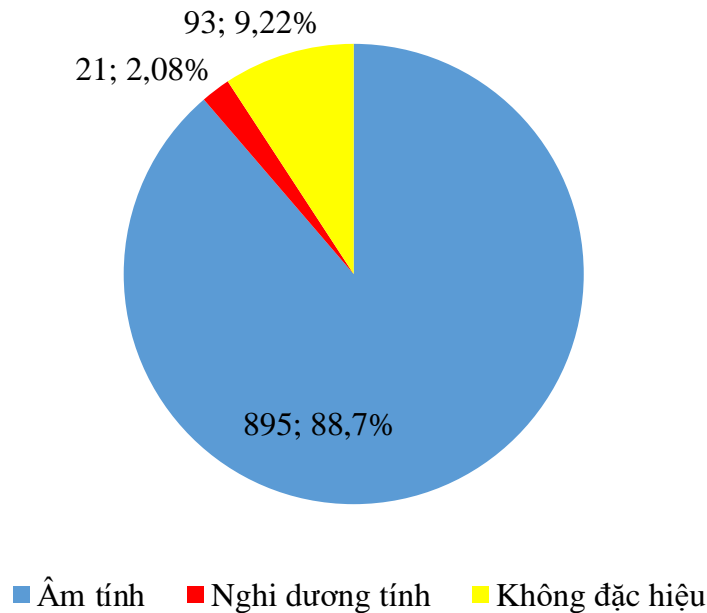
Hình 3.3. Kết quả RT-PCR sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cái

(+): Mẫu chứng dương, (-): Mẫu chứng âm, (MW): Thang trọng lượng phân tử 100bp
 Các giếng được đánh số tương ứng với mẫu muỗi cát cái được sàng lọc Flavivirus.

Kết quả sàng lọc được chia ra làm 2 nhóm:

Mẫu nghi ngờ dương tính với Flavivirus: có kích thước sản phẩm PCR trong khoảng 250 bp: mẫu 11, 24 (Hình 3.3.A), 28, 29, 30 (Hình 3.3.B).

Mẫu âm tính với Flavivirus: các mẫu không xuất hiện band, tương tự như các mẫu chứng âm: mẫu 18-20, 23 (Hình 3.3.A); mẫu 25-27 (Hình 3.3.B); mẫu 690, 698, 702 (Hình 3.3.C) hoặc các mẫu xuất hiện các band tại các vị trí không đặc hiệu (không tại vị trí 250bp): mẫu 17, 21 (Hình 3.3.A) hay các mẫu 689, 691-697, 699-701 (Hình 3.3.C).



Hình 3.4. Tỷ lệ sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cái

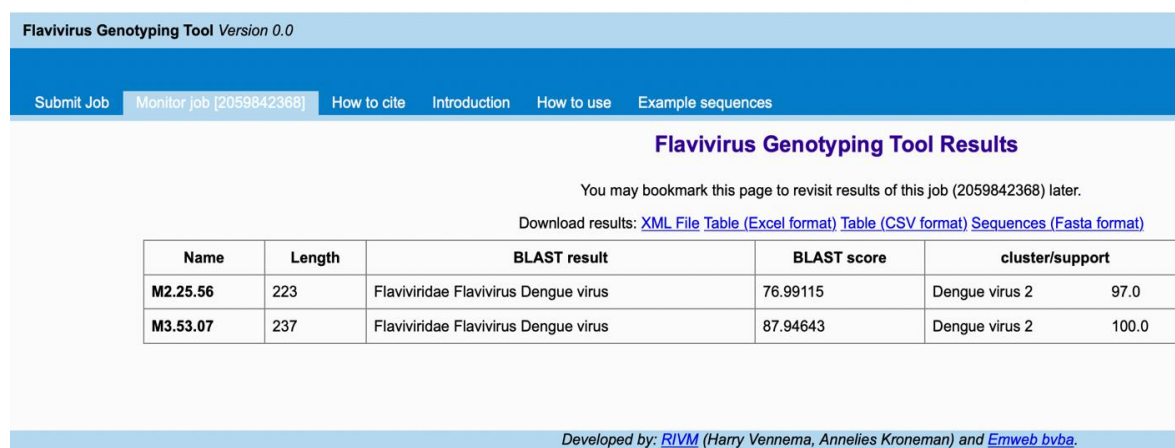
Kết quả sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cho thấy có 21/1009 mẫu được nghi ngờ là dương tính với Flavivirus hay ARN Flavivirus có liên quan đến muỗi cát (2,08%). 895 mẫu được xác định là âm tính với Flavivirus, chiếm tỉ lệ 88,7%, còn lại 93 mẫu có sản phẩm PCR, tuy nhiên lại không đặc hiệu với Flavivirus, các mẫu này chiếm tỉ lệ 9,22% (Hình 3.4).

Toàn bộ 21 mẫu dương tính với Flavivirus bằng phương pháp RT-PCR sẽ được tiến hành giải trình tự gen để khẳng định sự có mặt của Flavivirus trong quần thể loài muỗi cát được thu thập.

3.2.2. Xác định Flavivirus bằng phương pháp giải trình tự gen Sanger

Kết quả thu được sau khi giải trình tự của 21 mẫu nghi ngờ thu được kết quả: 16 mẫu mà trong đó chúng tôi không tìm thấy bất cứ thông tin nào khi so sánh các trình tự của các mẫu đó lên cơ sở dữ liệu gen của NCB. Có 3 mẫu có các trình tự cho kết quả tương đồng với Flavivirus, tuy nhiên độ dài đoạn tương đồng quá ngắn

(<31bp) để xác định. Sử dụng dữ liệu Flavivirus Genotyping Tool *Version 0.0* (<https://www.rivm.nl>) để phân tích đã xác định được 2 mẫu số 4 (M2.25.56) và 17 (M3.57.07) có các trình tự được xác định là Dengue týp 2 (DEN2). Mẫu M2.25.26 có độ dài 223 bp nằm trên vị trí 8928-9159 và mẫu M3.57.07 có độ dài 237 bp trên vị trí 8952-9189 của vùng gen NS5 (Hình 3.5).



Name	Length	BLAST result	BLAST score	cluster/support
M2.25.56	223	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	76.99115	Dengue virus 2 97.0
M3.53.07	237	Flaviviridae Flavivirus Dengue virus	87.94643	Dengue virus 2 100.0

Hình 3.5. Kết quả định loài Flavivirus trên web <https://www.rivm.nl>

3.2.3. Một số đặc điểm Flavivirus trên các loài muỗi cát cái

Trong số 6 tỉnh điều tra, kết quả sàng lọc ghi nhận sự xuất hiện của các đoạn ARN của DEN2 trên các cá thể muỗi cát cái ở 2 tỉnh là Ninh Bình và Lạng Sơn. Các tỉnh còn lại là Hà Giang, Lào Cai và Quảng Ninh, Sơn La chưa tìm thấy dấu vết của Flavivirus trên quần thể muỗi cát. Tỷ lệ muỗi cát cái mang ARN của Flavivirus (DEN2) trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu của chúng tôi là 0,198 % (n=2/1009)

Bảng 3.4. Thông tin mẫu nghi nhiễm Flavivirus trên quần thể muỗi cát

Tỉnh	Vĩ độ	Kinh độ	Muỗi cát	Sinh cảnh	Flavivirus
Ninh Bình (M2.25.56)	20°13.983'	105°42.704'	<i>Sergentomyia sp2</i>	Hang	DEN2
Lạng Sơn (M3.53.07)	21°56.069'	106°41.061'	<i>Sergentomyia barraudi</i>	Hang	DEN2

Mẫu muỗi cát cái mang ARN của DEN2 đầu tiên (M2.25.56) được thu thập ngày 28/06/2016 tại tổ Bái Ca, xã Cúc Phương, huyện Nho Quán, tỉnh Ninh Bình (vĩ độ 20°13.983'; kinh độ 105°42.704'). Mẫu này được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* thu thập trong hang.

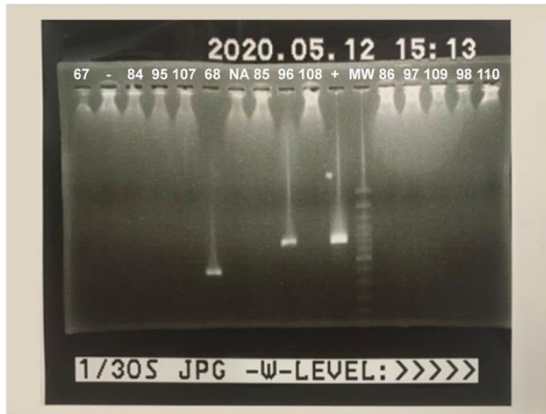
Mẫu muỗi cát cái mang ARN của DEN2 thứ 2 (M3.53.07) được thu thập ngày 03/8/2016 tại thôn Khom Khong, xã Hồng Phong, huyện Cao Lộc, tỉnh Lạng Sơn (vĩ độ: 21°56.069', kinh độ: 106°41.061'). Mẫu được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia barradi* thu thập ở sinh cảnh trong hang.

3.3. THỰC TRẠNG NHIỄM LEISHMANIA Ở MUỖI CÁT TẠI ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

3.3.1. Sàng lọc Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR

Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật Nested-PCR của Noyes và cs (1998)

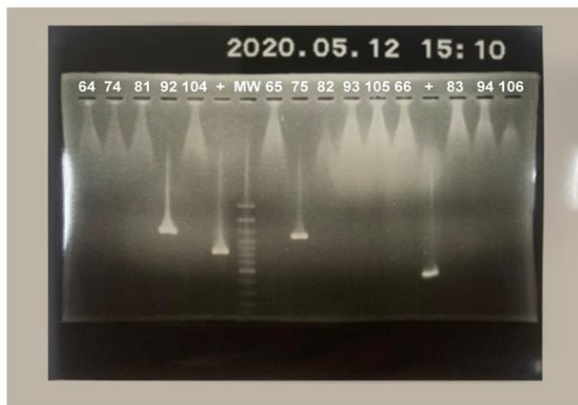
L1



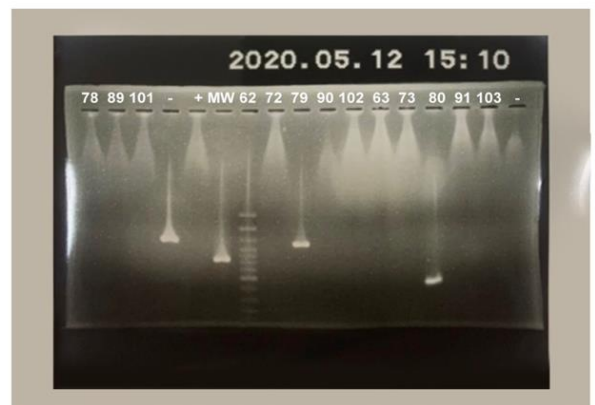
L2



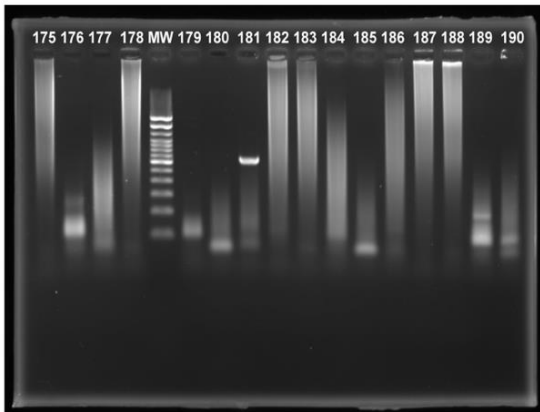
L3



L4



L5



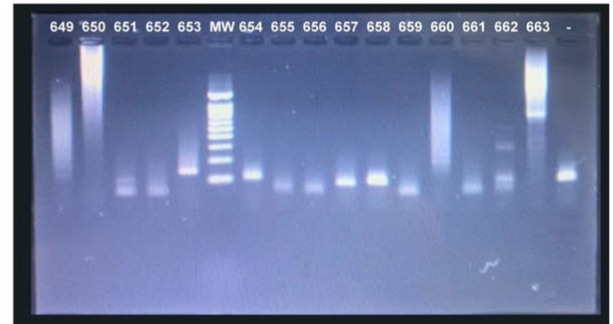
L6



L7



L8



Hình 3.6. Kết quả Nested-PCR sàng lọc Leishmania trên muỗi cát cái

(+): Mẫu chứng dương; (-): Mẫu chứng âm; (MW): Thang trọng lượng phân tử 100bp

Các giếng được đánh số tương ứng với mẫu muỗi cát cái được sàng lọc Leishmania

Trong số 1009 mẫu được sàng lọc, 20 mẫu dương tính với Nested PCR và 989 mẫu âm tính. Hình 3.6 là hình ảnh kết quả điện di của các mẫu nghi ngờ nhiễm Leishmania sau khi chạy sàng lọc bằng phương pháp Nested-PCR.

Bảng 3.5. Mẫu nghi nhiễm Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR (n=20)

Nhóm mẫu	Số lượng	Ký hiệu mẫu	Kích thước sản phẩm (bp)
1	02	Mẫu 68 (Hình 3.7A-L1) Mẫu 895 (Hình 3.7B-L6)	300
2	06	Mẫu 79 (hình 3.7A-L4) Mẫu 99 (hình 3.7A -L2) Mẫu 906, 907, 909, 910 (hình 3.8B -L7)	500
3	05	Mẫu 96 (hình 3.7A -L1) Mẫu 181(hình 3.7B -L5) Mẫu 900, 897 (hình 3.7B -L6) và 912 (hình 3.7B -L7)	600-750
4	07	Mẫu 69 (hình 3.7A -L2), Mẫu 75, 92 (hình 3.7A -L3) Mẫu 904, 905, 899 (hình 3.7B - L6) và 663 (hình 3.7B – L8)	≥ 800

Toàn bộ 20 mẫu này sẽ được tiến hành giải trình tự gen để khẳng định sự có mặt của Leishmania trong quần thể loài muỗi cát được thu thập.

3.3.2. Xác định Leishmania bằng phương pháp giải trình tự gen NGS

Giải trình gen bằng phương pháp NGS với bộ kit Nextera XT DNA Library Prep. Đồng đều thư viện mẫu bằng máy ISEQ 100 sử dụng phương pháp Standard Normalization – Illumina.

Kết quả sau khi giải trình tự của 20 mẫu dương tính với Nested PCR chúng tôi thu được tổng số 121,651 đoạn trình tự (10GB) với kích thước từ 20 bp đến 1728 bp (trung bình 73,945 bp). Chúng tôi loại bỏ các đoạn trình tự có kích thước quá nhỏ (dưới 200bp) thu được 71 đoạn trình tự gen phân tích (Bảng 3.6).

Bảng 3.6. Kết quả blast các trình tự thu được bằng phương pháp NGS lên cơ sở dữ liệu NCBI

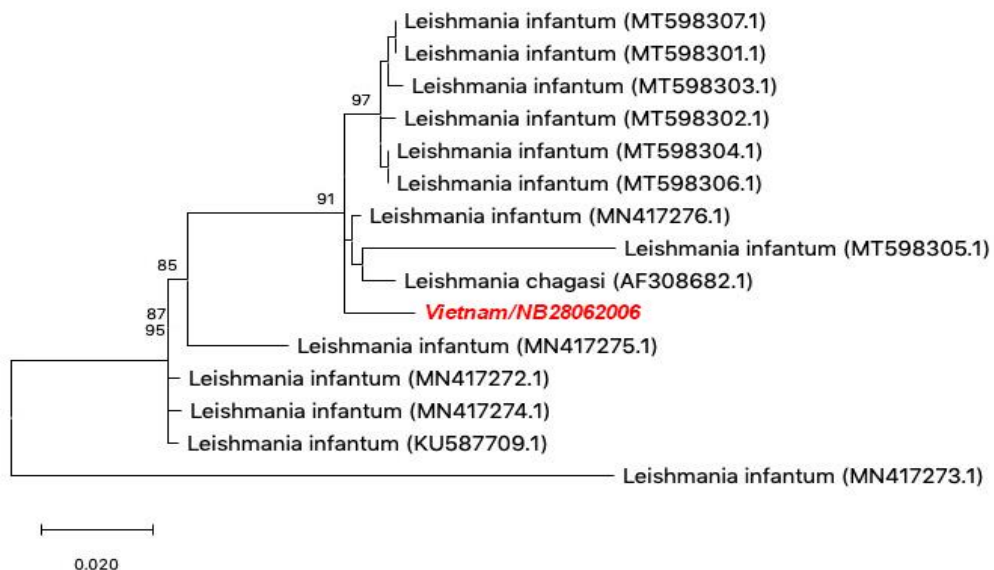
STT mẫu	Số trình tự có sự tương đồng với <i>Leishmania</i>	Số trình tự chưa xác định	Số trình tự không có thông tin	Tổng số trình tự
1		3		3
2	2	1	1	4
3			3	3
4	1		2	3
5		2	3	5
6		1	2	3
7		3		3
8			3	3
9			3	3
10			3	3
11		3		3
12		1	4	5
13		1	2	3
14		1	2	3
15		1	2	3
16			3	3
17		2	1	3
18		2	1	3
19			3	3
20	7		2	9
Tổng số	10	21	40	71

Trong số 71 trình tự thu được có 40 trình tự không tìm thấy thông tin khi Blast lên cơ sở dữ liệu gen của NBCI, 21 trình tự cho kết quả tương đồng tuy nhiên thông tin loài thu được không liên quan đến *Leishmania*. Chỉ có 10 trình tự được xác định là *Leishmania* thuộc về 3 mẫu: 2, 4, 20. Mẫu số 2 và 20 có trình tự gen tương đồng với các class 13, 16, 18, 25, 31, 38, 39 và 50 trên gen minicircle kinetoplas của *Leishmania infantum*, trong khi đó mẫu số 4 có trình tự tương đồng với nhiễm sắc thể 27 của *Leishmania* từ vị trí 251340 - 268948 (Bảng 3.7, Hình 3.7; 3.8 và 3.9).

Bảng 3.7. Kết quả phân tích các mẫu có trình tự có sự tương đồng với *Leishmania* bằng phương pháp NGS

Tên mẫu	Trình tự	Kích thước (bp)	Gen đích trên <i>Leishmania</i>	Vùng tương đồng (%)
Mẫu 2 (<i>Vietnam/NB28062006</i>)	2-2	616	Minicircle kinetoplast (kDNA minicircle)	Class 16 (98%)
	2-4	231		Class 25 (97%)
Mẫu 4 (<i>Vietnam/QN01062006</i>):	4-1	907	Nhiễm sắc thể 27 <i>L. dovanni</i>	251340 -252246 (99%)
			Nhiễm sắc thể 27 <i>L. infantum</i>	268542 -268948 (99%)
Mẫu 20 (<i>Vietnam/SL10102016</i>)	20-1	1086	Minicircle kinetoplast (kDNA minicircle)	Class 31 (94%) Class 38,39 (98%)
	20-2	715		Class 18 (96%)
	20-3	704		Class 25 (97%)
	20-4	670		Class 16 (99%)
	20-5	618		Class 13 (99%)
	20-6	560		Class 50 (85%)
	20-9	329		Class 16 (95%)

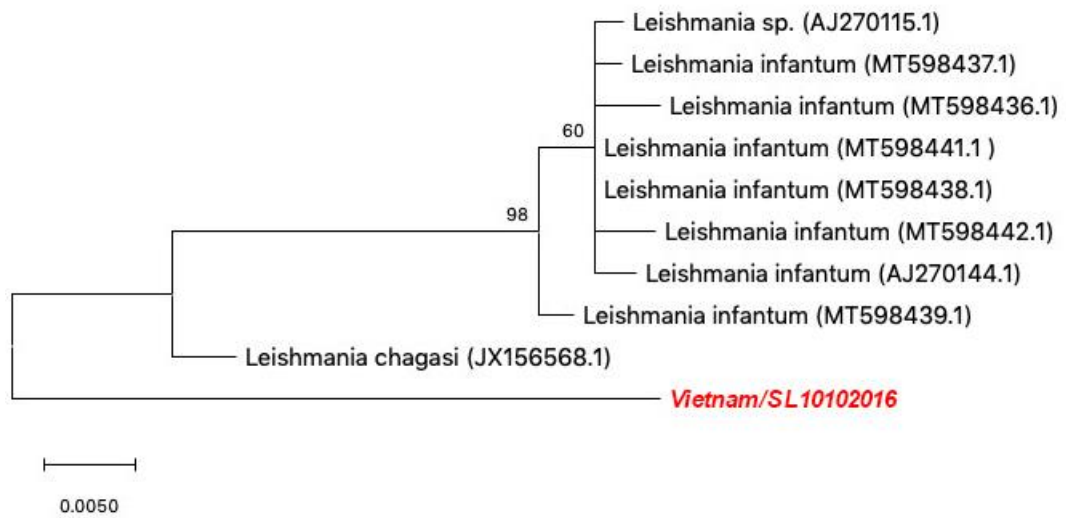
Trong 20 mẫu dương tính với Nested PCR, sau khi phân tích các trình tự thu được đã xác định được 3 mẫu có trình tự tương đồng với *Leishmania*: Mẫu số 2 (*Vietnam/NB28062006*): tương ứng với mẫu 69 (Hình 3.7A-L2): >800bp; mẫu số 20 (*Vietnam/SL10102016*): tương ứng với mẫu 79 (Hình 3.7A-L4): 500 bp và mẫu số 4 (*Vietnam/QN01062006*): tương ứng với mẫu 663 (Hình 3.7B-L8): >800bp.



Hình 3.7. Cây chủng loại phát sinh trên gen kDNA minicircle của mẫu thu thập tại Ninh Bình (*Vietnam/NB28062006*).

Bảng 3.8. So sánh các trình tự trong mẫu *Leishmania* ở Ninh Bình - Vietnam/NB28062006

Trình tự	Kích thước (bp)	Vùng gen trên kDNA minicircle	Các chủng tương đồng	Loài
2-2	616	class 16	MT598307.1, MT598304.1, MT598306.1, MT598302.1, MT598301.1, MT598303.1	<i>Leishmania infantum</i>
2-4	231	class 25	MT598345.1, MT598341.1, MT598347.1, MT598346.1, MT598343.1, MT598342.1, MT598344.1	<i>Leishmania infantum</i>



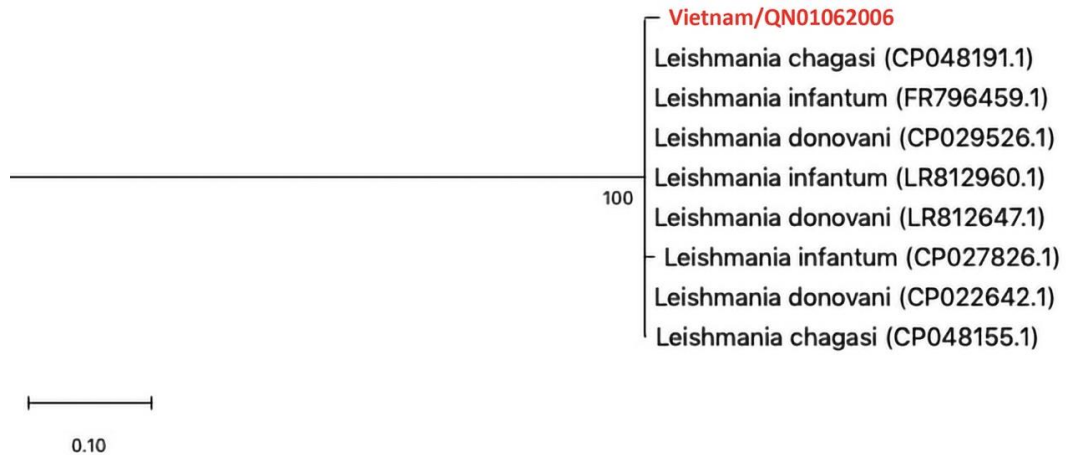
Hình 3.8. Cây chủng loại phát sinh trên gen kDNA minicircle của mẫu thu thập tại Sơn La (Vietnam/SL210102016).

Bảng 3.9. So sánh các trình tự trong mẫu Leishmania ở Sơn La - Vietnam/SL210102016

Trình tự	Kích thước (bp)	Vùng gen trên kDNA minicircle	Các chủng tương đồng	Loài
20-1	1086	class 31, 38, 39	JX156568.1, MT598442.1, MT598441.1, MT598439.1, MT598438.1, MT598437.1, MT598436.1, MT598440.1, MT598389.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-2	715	class 18	MT598315.1, MT598316.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-3	704	class 25	MT598346.1, MT598345.1, MT598341.1, MT598347.1, MT598342.1, MT598343.1, MT598344.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-4	670	class 16	MT598302.1, MT598306.1, MT598304.1, MT598307.1, MT598303.1, MT598301.1, MT598305.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-5	618	class 13	MT598284.1, MT598286.1, MT598285.1, MT598289.1, MT598288.1, MT598283.1, MT598287.1, EU437404.1, KY950666.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-6	560	class 50	JX156608.1	<i>Leishmania infantum</i>
20-9	329	class 16	MT598304.1, MT598307.1, MT598301.1, MT598303.1, MT598306.1, MT598305.1	<i>Leishmania infantum</i>

Trên cây chủng loại phát sinh, mẫu Vietnam/NB28062006 (Ninh Bình) và mẫu Vietnam/SL10102016 (Sơn La) cùng nhóm với chủng *Leishmania infantum* ở Bắc Phi 2020, Iran 2019, Senegal 2016 hay tên gọi khác ở Mỹ là tinh là *Leishmania*

chagasi ở Brazil 2012. Mẫu Vietnam/NB28062006 có trình tự gen tương đồng với 2 class 16, 25 trên gen kDNA minicircle của *Leishmania infantum* với tỷ lệ tương ứng 98% và 97%. Mẫu Vietnam/SL10102016 có trình tự gen tương đồng với 8 class 13, 16, 18, 25, 31, 38, 39 và 50 trên gen kDNA minicircle của *Leishmania infantum* với tỉ lệ tương đồng từ 85% đến 99% (Bảng 3.7).



Hình 3.9. Cây chủng loại phát sinh gen trên NST 27 của mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016).

Mẫu thu thập tại Quảng Ninh - Vietnam/QN01062016 cho thấy tương đồng với *Leishmania donovani* (Pháp) hoặc *Leishmania infantum* (Tây Ban Nha), cùng nhóm với *Leishmania sp.* tại Hy Lạp. Tuy nhiên, cơ sở dữ liệu phân tích dựa trên sự tương đồng tại nhiễm sắc thể 27 với 1 trình tự thu được có độ dài 907 bp, tương đồng với vị trí 251340 –252246 trên chủng *L. donovani* CP022642.1 và 268542-268948 trên chủng *L. infantum* LR812960.1, chưa đủ độ tin cậy để định loài mẫu này (Bảng 3.7).

>Leishmania donovani strain pasteur chromosome 27, complete sequence
 Sequence ID: CP022642.1 Length: 1159903
 Range 1: 251340 to 252246

Score:1670 bits(904), Expect:0.0,
 Identities:906/907(99%), Gaps:0/907(0%), Strand: Plus/Plus

Sample4	1	CCAGCGGGAGCGCCCGTCAGAGTCGCTGCAACGTGTTGGCGGAACCGCCGTCTTTGGTTG	60
Sbjct	251340		251399
Sample4	61	AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGGACCGAGCGCTTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC	120
Sbjct	251400		251459
Sample4	121	GACAAGTGCAGAGCATCAGCGCCGCCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGCGGAATGATGTA	180
Sbjct	251460		251519
Sample4	181	GGCTCGCACCGGAGCCGGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG	240
Sbjct	251520		251579
Sample4	241	TGCAGCACGTTCCGAAAAGGTAAGAAAAAGTGGAAACAGTGTGGCGCCCTGTCTC	300
Sbjct	251580		251639
Sample4	301	TGCACGCGGGTCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG	360
Sbjct	251640		251699
Sample4	361	TGGTAGTGATACgagagagagagagCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG	420
Sbjct	251700		251759
Sample4	421	TATGCGGTCTCTCTGTTTGTCTCCGTGAACCGCCCGCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG	480
Sbjct	251760		251819
Sample4	481	TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG	540
Sbjct	251820		251879
Sample4	541	TCACGCACCAGGGTGC GCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACAGCATAGACGCACTCGC	600
Sbjct	251880		251939
Sample4	601	GTATGGGTCTCGGGATGCTAAGCAAGCTGGCACATGTTGGCGAGGTGCTTCTGGATAA	660
Sbjct	251940		251999
Sample4	661	TGCGGAAGAGGGTTTAGGCTCCCAGAGATGCACTACCTCTCTCTCTGCGGCGCTCTG	720
Sbjct	252000		252059
Sample4	721	GGCACGGTTGGCATAAACGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCTCTCT	780
Sbjct	252060		252119
Sample4	781	TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCTCTCTGCTACTTTGACGTTCTCTCTCGCGCG	840
Sbjct	252120		252179
Sample4	841	CTCTGGCTTCTCCCATACGCGTGTGGTACTGGTGCAGGAGCTTGCCAAATCGCAACAA	900
Sbjct	252180		252239
Sample4	901	GAAGTGA 907	
Sbjct	252240	GAAGTGA 252246	

Hình 3.10. So sánh trình tự mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016) với chủng *L. donovani* CP022642.1

```

>Leishmania infantum genome assembly, chromosome: 27
Sequence ID: LR812960.1 Length: 1175412
Range 1: 268042 to 268948

Score:1670 bits(904), Expect:0.0,
Identities:906/907(99%), Gaps:0/907(0%), Strand: Plus/Plus

Sample4 1      CCAGCGGGAGCGCCCGTCAGAGTCGCTGCAACGTGTTGGCGGAACCGCCGCTTTGGTTG 60
                |||
Sbjct  268042  CCAGCGGGAGCGCCCGTCAGAGTCGCTGCAACGTGTTGGCGGAACCGCCGCTTTGGTTG 268101

Sample4 61      AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGACCAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC 120
                |||
Sbjct  268102  AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGACCAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC 268161

Sample4 121     GACAAGTGCAGAGCATCAGCGCCGCCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGGCGAATGATGTA 180
                |||
Sbjct  268162  GACAAGTGCAGAGCATCAGCGCCGCTCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGGCGAATGATGTA 268221

Sample4 181     GGCTCGCACCGGAGCCGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG 240
                |||
Sbjct  268222  GGCTCGCACCGGAGCCGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG 268281

Sample4 241     TGCAGCACGTTCCGCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGAACAGTGTGTTGGCGCCTGTCTC 300
                |||
Sbjct  268282  TGCAGCACGTTCCGCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGAACAGTGTGTTGGCGCCTGTCTC 268341

Sample4 301     TGCACGCGGGTCCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG 360
                |||
Sbjct  268342  TGCACGCGGGTCCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG 268401

Sample4 361     TGGTAGTGATACgagagagagagagCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG 420
                |||
Sbjct  268402  TGGTAGTGATACGAGAGAGAGAGAGCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG 268461

Sample4 421     TATGCGGTCCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG 480
                |||
Sbjct  268462  TATGCGGTCCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG 268521

Sample4 481     TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG 540
                |||
Sbjct  268522  TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG 268581

Sample4 541     TCACGCACCAGGGTGCAGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC 600
                |||
Sbjct  268582  TCACGCACCAGGGTGCAGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC 268641

Sample4 601     GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCACATGTTGGCGAGGTGCTTCCTGGATAA 660
                |||
Sbjct  268642  GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCACATGTTGGCGAGGTGCTTCCTGGATAA 268701

Sample4 661     TCGGAAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCCTCTCTTCTCTCTGCGGCCTCTG 720
                |||
Sbjct  268702  TCGGAAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCCTCTCTTCTCTCTGCGGCCTCTG 268761

Sample4 721     GGACGTTGGCATAAAGAGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT 780
                |||
Sbjct  268762  GGACGTTGGCATAAAGAGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT 268821

Sample4 781     TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCTCCTCCGCGCG 840
                |||
Sbjct  268822  TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCTCCTCCGCGCG 268881

Sample4 841     CTCTGGCTTCTCCCATACACGCGTGTGGTACTGGTGCAGGAGCTTGCCAAATCGCAACAA 900
                |||
Sbjct  268882  CTCTGGCTTCTCCCATACACGCGTGTGGTACTGGTGCAGGAGCTTGCCAAATCGCAACAA 268941

Sample4 901     GAAGTGA 907
                |||
Sbjct  268942  GAAGTGA 268948

```

Hình 3.11. So sánh trình tự mẫu thu thập tại Quảng Ninh (Vietnam/QN01062016) với chủng *L. infantum* LR812960.1

Như vậy, kết quả giải trình tự gen cho thấy trong 3 mẫu có sự tương đồng với *Leishmania*, 2 mẫu được xác định là *Leishmania infantum* và 1 mẫu là *Leishmania sp.*

3.3.3. Một số đặc điểm của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát

Trong số 6 tỉnh điều tra, kết quả sàng lọc ghi nhận sự hiện của *Leishmania* ở 3 tỉnh là Sơn La, Quảng Ninh và Ninh Bình. Các tỉnh còn lại là Hà Giang, Lào Cai và Lạng Sơn chưa tìm thấy dấu vết của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát. Tỷ lệ nhiễm *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu của chúng tôi là 0,297% (n=3/1009).

Bảng 3.10. Thông tin mẫu *Leishmania* trên quần thể muỗi cát (n=3)

Tỉnh	Vĩ độ	Kinh độ	Muỗi cát	Sinh cảnh	<i>Leishmania</i>
Quảng Ninh	20°59.615'	107°12.592'	NA	Hang	<i>Leishmania sp.</i>
Ninh Bình	20°14.457'	105°41.371'	<i>Sergentomyia sp2</i>	Ngoài nhà	<i>Leishmania infantum</i>
Sơn La	21°11.063'	104°03.277'	<i>Phlebotomus sp.</i>	Chuồng lợn	<i>Leishmania infantum</i>

Mẫu *Leishmania* đầu tiên (Vietnam/QN01062006) được thu thập ngày 01/06/2016 tại tổ 4 phường Quang Hanh, thành phố Cẩm Phả, tỉnh Quảng Ninh (vĩ độ 20°59.615'; kinh độ 107°12.592'). Mẫu này được sàng lọc trên muỗi cát cái thu thập trong hang đá.

Mẫu *Leishmania* thứ 2 (Vietnam/NB28062006) được khẳng định là *Leishmania infantum*, thu thập ngày 28/6/2016 tại thôn Sam, xã Cúc Phương, huyện Nho Quan, tỉnh Ninh Bình (vĩ độ: 20°14.457', kinh độ: 105°41.371'). Mẫu được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* thu thập ở sinh cảnh ngoài nhà.

Mẫu *Leishmania* thứ 3 (Vietnam/SL10102016) cũng đã được khẳng định là *Leishmania infantum*, thu thập ngày 10/10/2016 tại thôn Na Cang, xã Hát Lót, huyện Mai Sơn, tỉnh Sơn La (vĩ độ: 21°11.063', kinh độ: 104°03.277'). Mẫu được sàng lọc trên muỗi cát cái thuộc giống *Phlebotomus* thu thập ở trong chuồng lợn.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

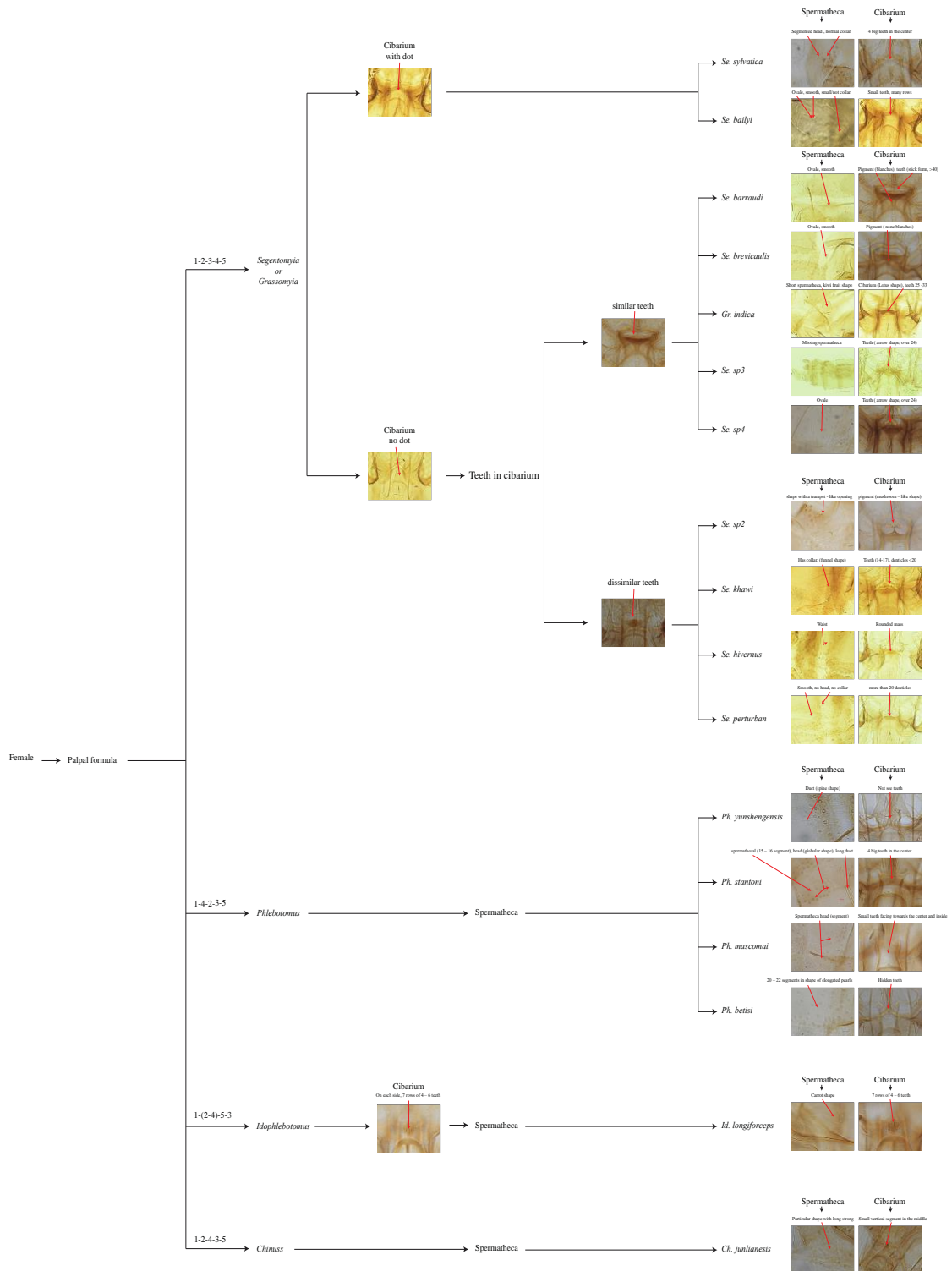
4.1. THÀNH PHẦN LOÀI VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SINH CỦA MUỖI CÁT TẠI 6 TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM, 2016-2018

4.1.1. Định loài muỗi cát ở Việt Nam bằng các đặc điểm hình thái

Nghiên cứu về muỗi cát tại Việt Nam từ thế kỷ XIX đến nay ít được cập nhật, các số liệu rất hạn chế, như nghiên cứu Raynal và cs (1935), Lewis (1978), Thai Aurélie và cs (2004), Một cuộc điều tra côn trùng bằng bẫy đèn của Thai Aurélie (8/2002 – 9/2002) tại 4 địa điểm Cửa Lò (Nghệ An), Huế (Thừa Thiên Huế), Mũi Né (Bình Thuận) và Mỹ Thiên (Cần Thơ) ghi nhận 6 loài muỗi cát [24]. Như vậy, tại Việt Nam các nghiên cứu trước năm 2004 đã mô tả 12 loài muỗi cát tại 18 điểm phía Bắc, 3 điểm miền Trung và 1 điểm ở miền Nam của Việt Nam. Trong số đó, *Ph. argentipes* được mô tả như một véc tơ tiềm năng của Leishmania [22, 24, 100]. Trong nghiên cứu này tại 6 tỉnh phía Bắc Việt Nam, chúng tôi ghi nhận 13 loài muỗi cát, trong đó 8 loài trùng với mô tả của các tác giả trước đây (*Se. barraudi* group, *Se. brevicaulis*, *Se. hivernus*, *Se. perturbans*, *Se. sylvatica*, *Se. bailyi*, *Gr. indica*, *Ph. stantoni*), 5 loài và 1 giống loài chưa từng được ghi nhận (*Se. khawi*, *Ph. yunshengensis*, *Ph. mascomai*, *Ph. betisi*, *Ch. junlianensis*, và *Idiophlebotomus* sp.). Nghiên cứu cũng phát hiện 2 loài mới cho giống *Sergentomyia* là *Se. sp2* và *Se. sp3* đồng thời một nhóm các tiêu bản có đặc điểm hình thái khác lạ của thuộc giống *Sergentomyia* được đặt là “*Se. und_sp*”. Đối với các loài mới này trong tương lai chúng tôi sẽ sử dụng các đặc điểm nhận dạng phân tử để khẳng định thêm cho nhận định này.

Đối với các tiêu bản đã được định danh trong nghiên cứu này, chúng tôi đề xuất “**Khoá định loại vắn tắt bằng hình ảnh cho các mẫu muỗi cát cái tại Việt Nam**”. Khoá định loại này được xây dựng riêng cho các mẫu ở Việt Nam dựa vào việc phân tích các đặc điểm hình thái học của 1049 mẫu tiêu bản muỗi cát cái đã thu thập được (Hình 4.1). Dựa vào độ dài các mảnh trên palpal chúng tôi sắp xếp chúng vào các giống khác nhau, cụ thể với công thức palpal là 1-4-(2-3)-5 chúng tôi xếp chúng vào giống *Phlebotomus* (hình 4.2), 1-(2-4)-5-3 giống *Idiophlebotomus*, 1-2-

4-3-5 giống *Chinius* và 1-2-3-4-5 là giống *Sergentomyia* hoặc *Grassomyia*. Các diễn giải chi tiết loài sẽ được chúng tôi đề cập dưới đây:



Hình 4.1. Khoá định loại vắn tắt bằng hình ảnh muối cát cái tại Việt Nam

Giống Phlebotomus

Giống Phlebotomus được ghi nhận với số lượng đứng thứ 2 (n=340 – 13,2%) trong 5 giống xác định trong nghiên cứu, và có 4 loài được định danh:

- *Ph. stantoni* là một loài khá dễ để nhận biết vì các tác giả trước đây mô tả rất chi tiết. Các đặc điểm túi chứa tinh và hàm của nhóm loài này rất khác biệt so với phần còn lại.

- *Ph. mascomai* được tương đồng về mặt địa lý sinh học vì Việt Nam có khoảng cách gần Thái Lan, quốc gia nơi mà loài này được mô tả lần đầu tiên [119]. Một điều quan trọng trong quá trình phân tích, chúng tôi thấy rằng loài này khá gần với *Ph. argentipes*, chúng khác với *Ph. argentipes* bởi công thức ăng-ten ở cả hai giới; chúng nhiều vòng hơn trên các túi chứa tinh của con cái; vị trí của các gai sinh dục trên gonostyle, sự phân thùy ít hơn trên paramere ở con đực và bởi chiều dài của ống dẫn tinh.

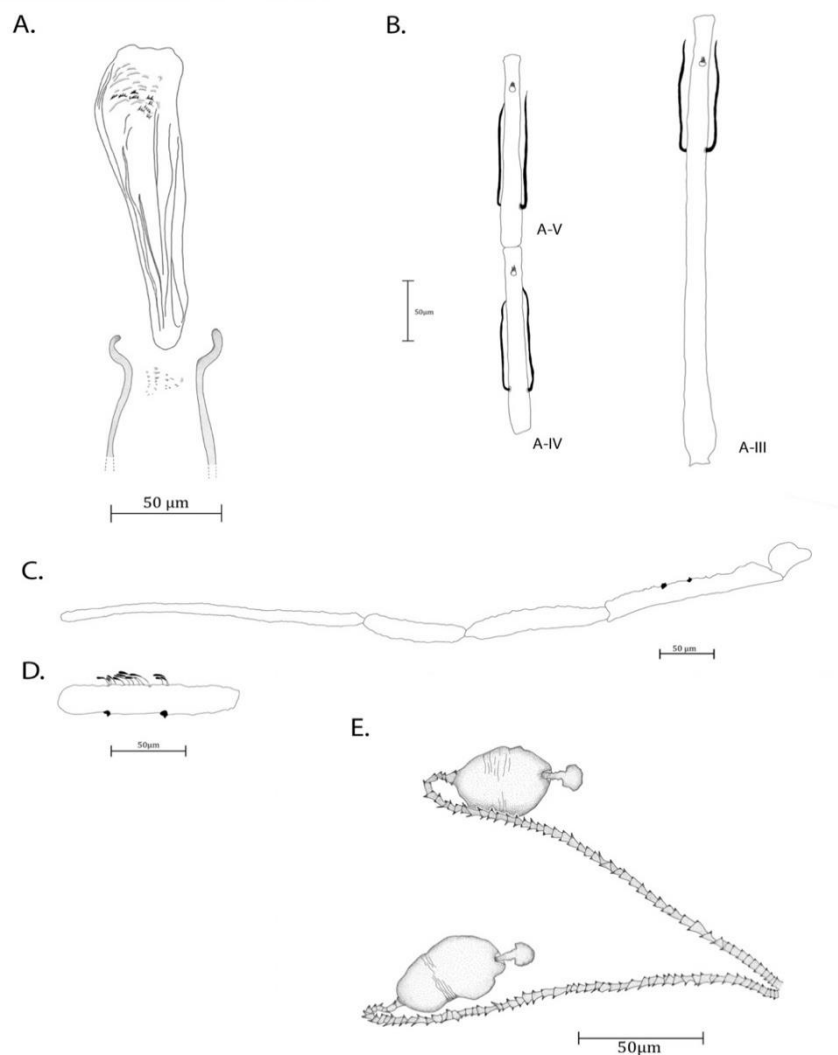
- *Ph. betisi* được xác định rất dễ dàng vì nó là loài duy nhất thuộc phân giống *Larrousius* được ghi nhận ở Đông Nam Á. Thêm vào đó, một số đặc điểm khác biệt để nhận dạng là cổ của túi chứa tinh hoặc vị trí của các gai trên gonostyle [86].

- *Ph. yunshengensis* được xác định ở 87 các thể muỗi cát (59 con đực và 28 con cái), có những đặc điểm chưa từng được quan sát thấy ở các loài được mô tả trước đây. Do đó, nghiên cứu mô tả một cách cụ thể cá thể *Ph. yunshengensis* cái. Phương pháp mô tả và danh pháp sử dụng theo Galati 2017 [66]. Các hình ảnh, thông số chi tiết phần đầu, bụng và phần phụ sinh dục được thể hiện trong hình 4.2. Các đặc điểm của cánh, chân và phần ngực không có vì các bộ phận này được sử dụng để làm các phân tích sinh học phân tử.

○Phần đầu:

- Trâm (Oc): có các setae rõ rệt, phân bố hai đường nhỏ;
- Clypeus (cl): dài 112,5 μm , rộng 68,7 μm với 20 setae phân bố ngẫu nhiên;
- Mắt kép (E): dài 208 μm , rộng 83 μm với khoảng 90–100 mắt đơn;
- Cấu trúc của interantennal (ias): có dạng không hoàn chỉnh;
- Cấu trúc của interocular (ios): có dạng hoàn chỉnh nhưng không thấy ias 1;

- Hàm (Hình 4.2A): có 1 nhóm 25 răng rời rạc, không thấy vùng xơ hoá;
- Hình dạng đầu (Hình 4.2A): có các răng giống chấu nhỏ ở phía sau và một số răng dạng tam giác ngắn ở phía trước;
- Đốt ăng ten (Hình 4.2B): $f_1 = 369 \mu\text{m}$, $f_2 = 154 \mu\text{m}$, $f_3 = 158.3 \mu\text{m}$. f_1 dài hơn so với $f_2 + f_3$. Công thức ăng ten: $2/f_1 - f_7$ với các lông cảm giác dài, nhưng không tới asticle sau, đốt ăng ten sau f_9 bị hỏng;
- Có 1 papilla trên f_1-3 . Không có các setae đơn trên f_1-3 , và có 1 setae đơn ở f_4-f_7 .



Hình 4.2. Hình ảnh phần đầu, bụng và phần phụ sinh dục của *Ph. yunshengensis* cái.

- A: Đầu và Hàm; B: Đốt ăng ten 3, 4, và 5; C: palpal; D: chi tiết của của palpal 3;
E: Túi chứa tinh

- Palpal (hình 4.2C, 4.2D) p1 = 33 μm , p2 = 164 μm , p3 = 120 μm , p4 = 97 μm , p5 = 283 μm . Công thức Palpal: 1, 4, 3, 2, 5. Có 2 nhóm với 10 Newstead's sensillae và 3 ở giữa của palpal 3 và không thấy trên các palpal khác. Có 1 spiniform setae trên p3; 4 trên p4 and 8 trên p5;
 - Labrum-Epipharynx (phần phụ miệng) dài 223. f1/E = 1.65;
 - Labium (vòi): labial furca dạng đóng.
 - **Phần bụng:**
 - Đốt bụng VIII có 30 setae mỗi bên;
 - Đốt bụng IX không có mấu lồi nào.
 - **Túi chứa tinh (hình 4.2E):**
 - Túi chứa tinh bề mặt trơn thành mỏng, phần đầu nhô ra ngoài giống như nấm. Ống dẫn dài 184 μm giống dạng sán dây.

Giống Idiophlebotomus

Idiophlebotomus được ghi nhận phân bố ở vùng Palaearctic và châu Úc [29]. Trong nghiên cứu này của chúng tôi cũng xác định được giống này với số lượng rất nhỏ (n=14) trong tổng số 2585 mẫu thu thập, đứng thứ 4/5 giống trong nghiên cứu. Việc lấy mẫu của chúng tôi có thể bao gồm hai quần thể được xác định là *Id. longiforceps* hoặc một loài có quan hệ họ hàng gần với loài này. Tại thời điểm này, do số lượng mẫu nhỏ nên chúng tôi muốn xác định tất cả các mẫu vật trong nghiên cứu là *Idiophlebotomus sp.* Hy vọng trong thời gian tới, chúng tôi có thể thu thập được nhiều cá thể muỗi cát của nhóm hơn và có các nghiên cứu sinh học phân tử sâu hơn để xác định rõ ràng thành phần loài của nhóm này.

Giống Chinius

Giống Chinius (Leng, 1987) thuộc một đơn vị phân loại riêng biệt được sử dụng cho một số loài muỗi cát ở Trung Quốc [97]. Giống Chinius chưa từng được ghi nhận ở Việt Nam. Các mẫu vật (n=31) của chúng tôi bắt trong hang động, được xác định là *Ch. junlianensis* theo gân R2 ngắn của cánh [97] và theo chiều dài của aedeagal (bộ phận sinh dục đực) và ống dẫn của túi chứa tinh ở con cái [57].

Giống Grassomyia

Trong nghiên cứu, giống *Grassomyia* xác định được 1 loài duy nhất *Gr. indica* với số lượng nhỏ nhất trong nghiên cứu (n=6). Việc phân loại của *Gr. indica* cần được sửa đổi trên cơ sở phân loại tổng hợp của toàn bộ giống, bao gồm tất cả các loài có sẵn và nhiều quần thể từ Châu Phi, Madagascar và Châu Á. Trong khi chờ sửa đổi này, chúng tôi cho rằng *Gr. indica* là một loài hợp lệ theo những mô tả của Quate đưa ra [137]. Tuy nhiên, chúng tôi đã quan sát thấy một số khác biệt giữa các mẫu vật ở Ấn Độ và những mẫu chúng tôi nghiên cứu, tức là số lượng răng trên cibarial dao động từ 33 đến 36 trong mô tả ban đầu, trong khi nó dao động từ 25 đến 33 ở nghiên cứu này (Hình 4.3). Dù vậy, chúng tôi vẫn thấy rằng các mẫu vật trong nghiên cứu thuộc về *Gr. indica*.

Giống Sergentomyia

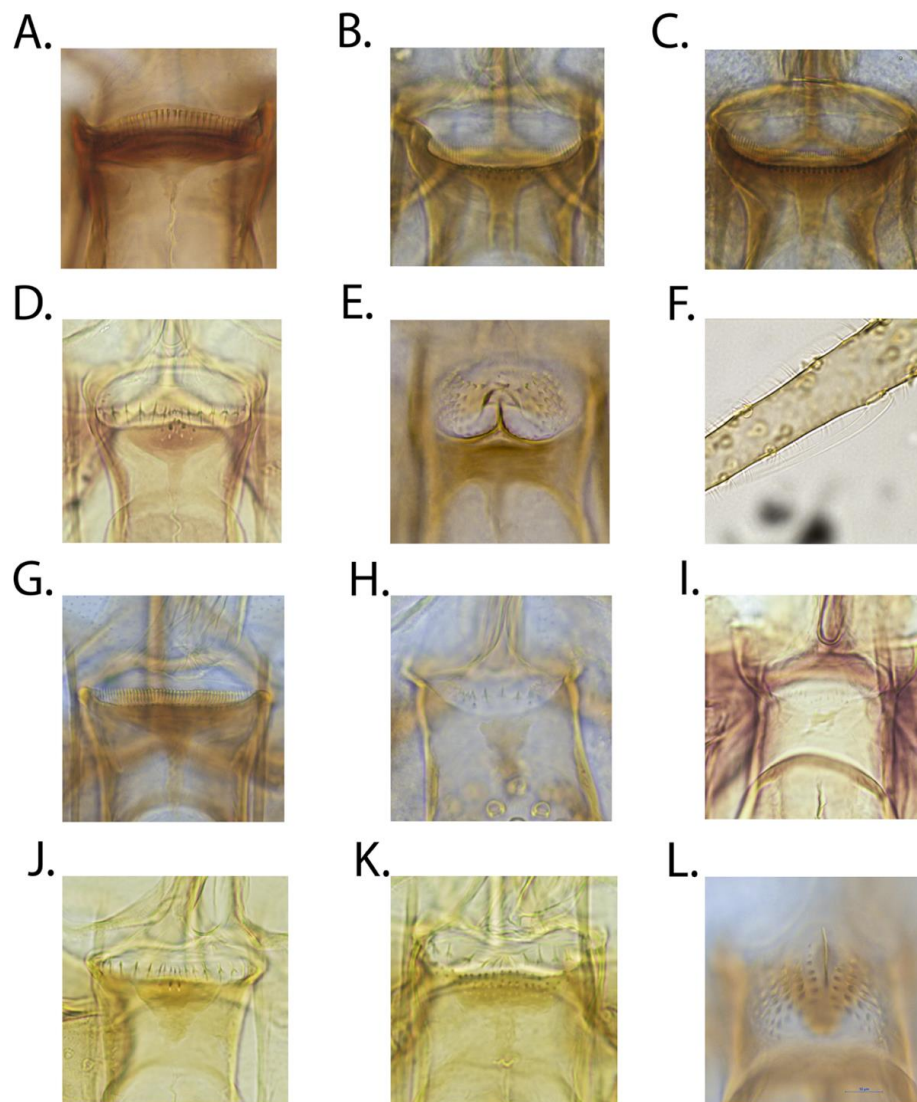
Giống *Sergentomyia* chiếm tỷ lệ cao nhất trong quần thể muỗi cát thu thập tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam với 2067 cá thể, chiếm tỷ lệ 80%, trong đó có 7 loài đã được định danh.

Đối với các loài trong giống *Sergentomyia*, dựa vào việc có các vùng xơ hoá dưới hàm (dot), chúng tôi phân hoá nhóm này thành 2 nhóm: 1 nhóm có dot và 1 nhóm không quan sát được các dot dưới hàm (Hình 4.2). Trong nhóm không quan sát được các dot, chúng tôi dựa vào hình dạng răng trên hàm để định loại tiếp.

Se. barraudi groups cần được nghiên cứu thêm vì có sự khác biệt đáng kể về các đặc điểm hình thái, chẳng hạn như số lượng và sự phân bố của răng trên hàm. Hàm trong mô tả ban đầu được thực hiện từ các mẫu vật của Ấn Độ bao gồm 40 răng và có một phân nhánh ở trước vùng xơ cứng [158]. Các mẫu vật mà chúng tôi đã kiểm tra cho thấy một khu vực bị xơ cứng phân nhánh tương tự nhưng có 52 đến 70 răng (Hình 4.3B, 4.3C), xuất hiện hoàn toàn khác với mô tả ban đầu. Xem xét các tiểu vùng địa lý sinh học khác nhau của khu vực Ấn-Mã Lai, dường như các quần thể loài này từ Việt Nam được tiến hoá từ các quần thể Ấn Độ, và đến nay có thể đã thuộc các loài khác nhau. Theo chúng tôi, *Se. brevicaulis* có thể được tách ra từ *Se. barraudi groups* không xem xét đến số lượng răng của cibarial, nhưng xem xét đến việc thiếu một phần phân nhánh trước của vùng bị xơ cứng trên hàm.

Nhiều bản ghi của *Se. iyengari* đã được thực hiện ở Đông Nam Á. Tuy nhiên, loài này đã được mô tả từ miền Nam của Ấn Độ [152]. Theo đó, tất cả các *Se. iyengari* ở Đông Nam Á trên thực tế là *Se. khawi* (Hình 4.3D) [23].

Trong số các loài được coi là nằm chung trong nhóm với *Se. iyengari*, thì rõ ràng là của *Se. hivernus* không phải vậy. *Sergentomyia hivernus* hiện được coi là một loài hợp lệ có thể được xác định nhờ vào ống sinh tinh rộng và số lượng răng ít hơn trên hàm [129, 134].



Hình 4.3. Hình thái hàm của các con cái

Grassomyia indica (A), *Sergentomyia barraudi* group (B, C), *Se. khawi* (D), và *Se. anodontis* group (E), ascoid trên Đốt ăng ten 3 của *Se. sp.3* (F), hàm của *Se. brevicaulis* group (G), hàm của *Se. sylvatica* (H), hàm của *Se. bailyi* (I), hàm của *Se. hivernus* (J), hàm của *Se. perturbans* group (K), hàm của *Idiophlebotomus* sp. (L).

Sergentomyia bailyi đã được mô tả ở Ấn Độ từ các mẫu thu thập ở các độ cao khác nhau, từ mực nước biển đến 1830m so với mực nước biển [159]. Sinton giải thích rằng ông đã quan sát thấy sự thay đổi đáng kể trong quá trình lấy mẫu của mình, theo độ cao nơi các mẫu vật tổ chức, cho thấy một phân loài đối với các mẫu vật được thu thập ở độ cao lớn (*Se. bailyi campester*). Sau đó, Raynal và Quate đã mô tả lại *Se. bailyi* từ Đông Nam Á [20, 137], phù hợp với mô tả ban đầu nhưng nhấn mạnh sự thay đổi về chiều dài của đốt ăng ten, răng trên hàm, và sự vắng mặt vùng xơ cứng của hàm. Mặt khác, trong nghiên cứu của THAI Aurélie thì *Se. bailyi* là loài ưu thế ở khu vực miền Trung Việt Nam và là loài duy nhất tìm được ở Huế [24]. Điều này cũng tương đồng với cuộc điều tra bẫy đèn tại miền Trung của chúng tôi năm 2020, kết quả cho thấy *Se. bailyi* là loài chiếm ưu thế ở khu vực 3 tỉnh Huế, Quảng Bình, Quảng Nam. Đối chiếu lại kết quả nghiên cứu, chúng tôi nhận ra rằng tỉ trọng lớn cá thể loài *Se. bailyi* được tìm thấy tại Ninh Bình (n=49, 89%), và Ninh Bình cũng có độ cao thấp nhất trong 6 tỉnh nghiên cứu.

Sergentomyia sylvatica thu thập trong nghiên cứu này phù hợp với mô tả ban đầu của Rynal và cộng sự: một vài răng ở trung tâm của hàm và túi chứa tinh thì không phân đoạn hoàn toàn [21].

Việc khẳng định tính độc lập của loài *Se. perturbans* vẫn chưa thật sự rõ ràng. Loài này đã được mô tả ở Indonesia [55], hay hình thái hàm của con cái được mô tả sau đó từ các mẫu vật của Trung Quốc [100, 129] và Lewis (1978) cũng giải thích sự nhầm lẫn liên quan đến các loài tên gọi khác *Ph. sylvestris* nhưng thực chất vẫn là *Se. perturbans*. Việc chụp các mẫu vật mới từ các quốc gia khác nhau và nghiên cứu hình thái của chúng cùng với phương pháp tiếp cận phân tử, sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về *Se. perturbans*. Các mẫu vật được quan sát trong nghiên cứu hiện tại cho thấy hình thái cibarial và túi chứa tinh phù hợp với mô tả lại của Lewis 1978 [100], nhưng chúng cũng cho thấy một số răng thẳng đứng chưa từng được ghi nhận trước đây. Do đó, kết quả của chúng tôi về *Se. perturbans* có lẽ sẽ có những bằng chứng cụ thể trong tương lai nhằm làm rõ đặc điểm hình thái đặc thù của loài này ở Việt Nam.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi gọi là *Sergentomyia sp.2* (*Se. sp2*) là muỗi cát có quan hệ họ hàng gần với *Se. anodontis*. Tại thời điểm hiện tại, chúng tôi khó có thể xem xét liệu các mẫu vật thu thập được thuộc về *Se. anodontis* hay là một loài mới. Trong mô tả ban đầu, hàm của *Se. anodontis* được mô tả là “không có răng, nhưng có vùng xơ hoá hình chữ V ngược” [136], và hình vẽ minh chứng cũng cho thấy không có bất kỳ răng bên nào. Tuy nhiên, các cá thể quan sát được ở Việt Nam lại có nhiều răng nhỏ bên (Hình 4.3E), rất khác biệt so với quần thể ban đầu. Các mẫu *Se. sp2* chúng tôi thu thập được có hàm phát triển với một hệ thống răng nhỏ xếp nhiều hàng dày ở xung quanh, vùng trung tâm của hàm là tấm xơ cứng có hình nấm (Hình 4.3E). Hình dạng túi chứa tinh (Hình 4.1) dạng phễu mở, thân uốn cong và có phần đầu lớn. Chúng tôi không biết liệu sự khác biệt này là ở mức độ cụ thể hay phổ biến. Hơn nữa, túi chứa tinh của các mẫu vật từ Việt Nam dường như rộng hơn ở phần đỉnh của chúng so với mô tả ban đầu.

Chúng tôi gọi *Se. sp3* là một loài thuộc giống *Sergentomyia* với một spur trên ascoid (Hình 4.3F), mà chúng tôi nghĩ rằng vẫn chưa được mô tả, đang chờ đợi thêm các mẫu và dữ liệu phân tử để có thể mô tả một cách chính xác hơn.

Một nhóm không đồng nhất gồm 83 mẫu vật mà chúng tôi chưa thể xác định được ở đây được đặt tên là các loài chưa xác định (*und_sp.*). Một số tiêu bản trong nhóm này chúng tôi quan sát thấy có những đặc điểm rất khác biệt như: Có các răng đồng dạng hình lưỡi mác trên hàm, độ xơ hoá cao và đồng nhất ở hàm, túi chứa tinh lớn hình ovale. Do vậy, chúng tôi đang nhóm lại và tạm đặt tên nhóm này là *Se. sp.* Tuy nhiên, chúng tôi sẽ cần thực hiện các phân tích bổ sung để có thể sắp xếp chúng. Các phương pháp mới đang được phát triển và dữ liệu phân tử là cần thiết vì trong số các mẫu vật này nhiều khả năng có thể chứa các loài mới để mô tả.

4.1.2. Sinh học sinh thái và sinh cảnh của muỗi cát ở các tỉnh điều tra

Sự phân bố của muỗi cát, bao gồm tất cả các loài, là khác nhau giữa các tỉnh về số loài cũng như độ phong phú và mật độ. Số lượng loài muỗi cát lớn nhất được thu thập ở Lạng Sơn và Ninh Bình, số lượng thấp nhất ở Lào Cai (Bảng 3.2 và hình 3.1). Sự khác biệt giữa các tỉnh này có lẽ là do Lạng Sơn và Ninh Bình có nhiều đỉnh núi đá hình tròn, thường được gọi là “ô bánh mỳ”. Điều đáng chú ý là chính

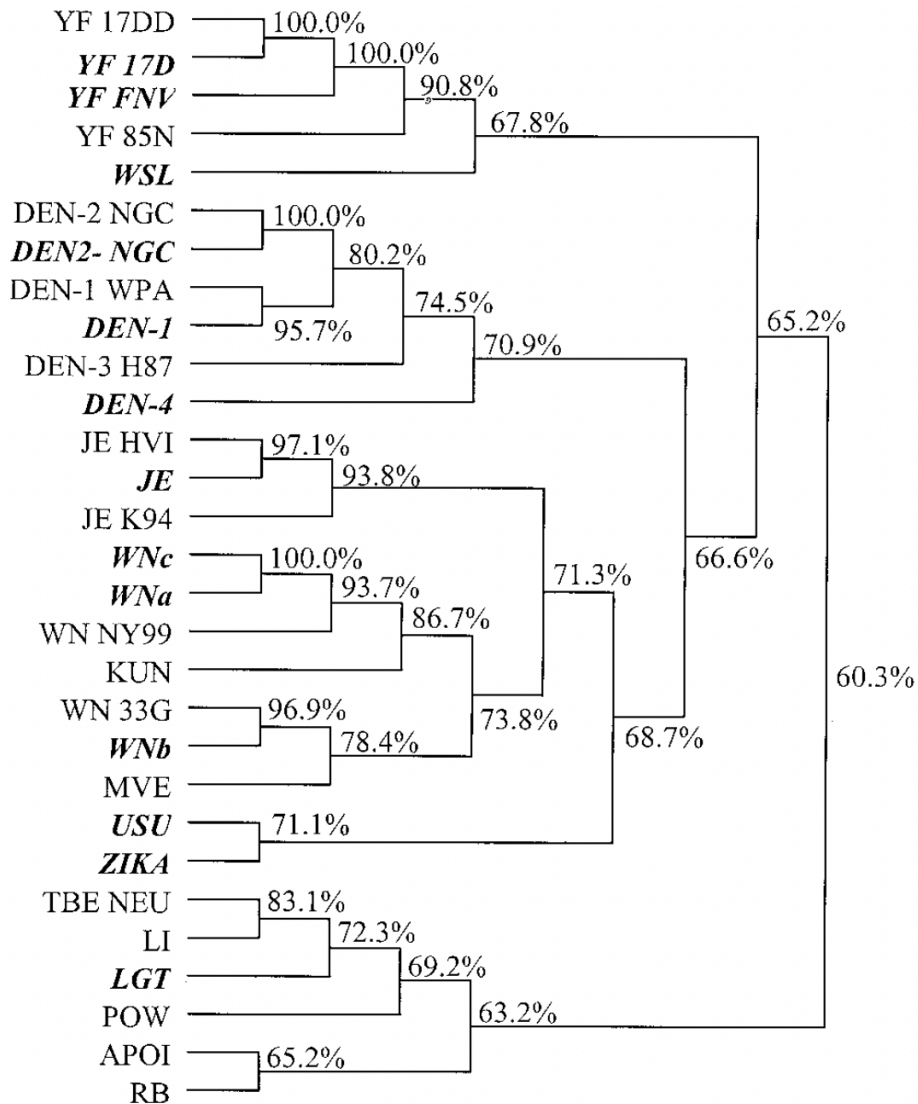
trong những “ổ bánh mỳ” này là nơi trú ẩn của các hang động và khe hở mà 55,36% số lượng muỗi cát đã được thu thập. Tất cả các giống và loài bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3* đã được báo cáo trong các môi trường cụ thể này. Các nghiên cứu trước đây được thực hiện ở Đông Nam Á (Thái Lan: $SR_{hang}=13$), cũng như ở Châu Phi (Trung Phi: $SR_{hang}=7$, $D=0,6$) và Nam Mỹ (Brazil: $SR_{hang}=17$), đã báo cáo rằng những môi trường này rất thuận lợi cho loài muỗi cát [47, 124, 170]. Sau các hang động và khe nứt, các khu vực ngoài nhà là môi trường sống được ưa thích tiếp theo, bao gồm cả các khu vườn (Bảng 3.3), với 936 mẫu vật được thu thập trong môi trường này, chiếm 36,21% số lượng mẫu. Hơn nữa, 16 mẫu muỗi cát được thu thập trong chuồng chó, chiếm mật độ 0,36; thấp hơn mật độ tìm thấy trong hang động ($D_{hang}=0,79$) nhưng cao hơn mật độ tìm thấy ở khu vực ngoài nhà ($D_{ngoài\ nhà}=0,23$) và các khu vực khác. Ở môi trường trong nhà và trong chuồng nuôi gia cầm/ gia súc/ lợn, số lượng muỗi cát thu được và mật độ của chúng rất thấp. Kết quả thống kê cho thấy sự phân bố của các loài không khác biệt về mặt thống kê theo tình hình nhưng có sự khác biệt mạnh theo môi trường. Giá trị độ phong phú loài cao nhất được tìm thấy trong hang động và ngoài trời ($SR=15$ bao gồm *Se. sp2* và *Se. sp3*). Trong chuồng gia súc và trong nhà, sự phong phú của các loài dao động từ 5 đến 9, cho thấy nhiều hành vi ưa đốt người hoặc sự hấp dẫn đối với động vật nuôi trong nhà đối với một số loài như *Ph. stantoni*. Trên thực tế, mặc dù loài này được tìm thấy trong mọi môi trường, nhưng nó là loài chính được thu thập chính ở trong nhà (11/30 mẫu vật; 36,67%) và trong chuồng chó (7/16 mẫu; 43,75%). Trong các hang động, loài này chỉ chiếm 2,24% (32/1431 mẫu vật). Cần có những nghiên cứu sâu hơn về sở thích kiếm ăn của loài này vì nó được mô tả là loài trong hang động ở Thái Lan ($SR_{hang}=26$) và Malaysia ($SR_{hang}=18$, $n=1548$) [35, 135, 157].

4.2. THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS Ở MUỖI CÁT TẠI ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

4.2.1. Xác định Flavivirus trên muỗi cát

NS5 là một protein có kích thước lớn (103kD), có tính bảo tồn cao. Thiết kế cặp mồi cFD2/MAMD trên vùng gen NS5 để xác định các Flavivirus trong các mẫu bệnh phẩm đã được tối ưu hoá trong nghiên cứu của Natale Scaramozzino và cộng

sự (2001). Cặp mồi này được thiết kế trên gen NS5 cho phép khuếch đại 51 loài Flavivirus [118]. Scaramozzino trong nghiên cứu của mình khẳng định việc sử dụng các đoạn trình tự ngắn (dưới 250 bp) hoàn toàn có thể xác định được các chủng Flavivirus (Hình 4.4). Vi rút New York 99 West Nile (WN NY99) được xác định lần đầu tiên bằng việc sử dụng cặp mồi này và cũng đã xác định được cả 4 tít Dengue.



Hình 4.4. Các trình tự khuếch đại bằng mồi cFD2 và FS778 của Flavivirus [150].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, mẫu phân tích sau khi có sản phẩm RT-PCR được khuếch đại bằng cặp mồi cFD2/MAMD (250 bp) đã được giải trình tự đoạn gen để khẳng định [150]. Kết quả trong nghiên cứu xác định được 2 trình tự tương đồng với vi rút DEN2. Điểm khác biệt của nghiên cứu là mẫu chúng tôi sàng

lọc là dịch nghiền của muỗi cái còn trong nghiên cứu của Scaramozzino sử dụng mẫu bệnh phẩm trên người. Điều này cho thấy các chủng vi rút DEN2 mà muỗi cái mang có mối liên quan với các mẫu DEN2 trên bệnh nhân. Mặc dù điều này chưa chứng minh được vai trò truyền DEN2 nói riêng và Flavivirus nói chung của muỗi cái, tuy nhiên qua nghiên cứu này chúng ta cũng nhận thấy việc muỗi cái mang Flavivirus và đặc biệt là DEN2 là hoàn toàn có thể. Trong bối cảnh các vùng sinh thái tự nhiên đang bị thu hẹp do các tác động đô thị hoá thì khả năng các vi rút cũng biến đổi để thích nghi với điều kiện mới. Trong tương lai, chúng tôi hy vọng có thể có các nghiên cứu sâu hơn về vai trò gây bệnh của các chủng vi rút này.

So sánh trình tự nucleotide đoạn gen thu được trong nghiên cứu cho thấy 2 mẫu M2.25.26 và M3.27.07 tương đồng với chủng DEN2_China_SZ_2015_KU094070.1 phân lập từ mẫu bệnh phẩm thu thập trên người ở Trung Quốc, năm 2015 với tỷ lệ tương đồng là 82% và 93%. Việc 2 đoạn trình tự thu được trên muỗi cái tương đồng với vi rút DEN2 trên người ở Trung Quốc, là quốc gia có đường biên giới với Lạng Sơn đặt ra mối quan tâm về mối liên hệ và sự lưu hành của các vi rút DEN2 mặc dù số mẫu xác định được trong nghiên cứu là rất nhỏ (n=2). Cùng với các hoạt động kinh tế, du lịch đang ngày càng gia tăng giữa Lạng Sơn với Trung Quốc, việc phát hiện ra ARN trên một véc tơ mới như muỗi cái gợi ý việc giám sát chặt chẽ ca bệnh và véc tơ trong chương trình phòng chống SXHD tại Lạng Sơn nói riêng và trong chương trình giám sát SXHD nói chung. Đặc biệt, các hiểu biết về tập tính và sinh thái của loài muỗi cái mang ARN DEN2 này thuộc giống *Sergentomyia* từ trước tới nay được đánh giá là ít có vai trò truyền bệnh. Do vậy, việc định loại và phát hiện DEN2 có thể mở ra mối quan tâm cho các đề tài nghiên cứu khác kết hợp cùng tham gia để làm sáng tỏ vai trò truyền Flavivirus đặc biệt là DEN2 của giống muỗi cái *Sergentomyia*.

4.2.2. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus trên muỗi cái

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 0,198% quần thể muỗi cái thu thập tại thực địa nghi nhiễm Flavivirus, mang ARN của DEN2. Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam công bố điều này.

Một nghiên cứu khác của Gregory Moureau năm 2010 cũng công bố phát hiện ARN của Flavivirus trên muỗi cát. Trong nghiên cứu này, 1508 muỗi cát thu thập ở Pháp và Algeria, từ tháng 8 năm 2006 đến tháng 7 năm 2007, 2 pool con đực trong số 67 pool của loài *Phlebotomus perniciosus* này ở Algeria đã dương tính với Flavivirus. Kết quả 2 pool này có trình tự tương đồng với các Flavivirus, liên quan đến côn trùng truyền của giống *Culex*. Đây là mô tả đầu tiên về các Flavivirus chỉ dành cho côn trùng thuộc họ *Culicidae* (bao gồm các giống muỗi *Aedes*, *Culex*, *Mansonia*, *Anopheles*), được tìm thấy trên muỗi cát thuộc họ *Psychodidae*. Điểm khác biệt của nghiên cứu này với nghiên cứu của chúng tôi là phát hiện được Flavivirus trên muỗi cát đực. Do vậy, trong tương lai khi sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát chúng tôi sẽ đề xuất nên tiến hành cả trên con đực và con cái để hiểu rõ hơn bản chất của vi rút nhóm Flavivirus.

Nghiên cứu của Mirsada Hukić năm 2020 phát hiện 1 chủng virus Flavivirus mới ở muỗi cát ở Bosnia và Herzegovina. Phương pháp sàng lọc của nghiên cứu này giống với nghiên cứu của chúng tôi khi cùng sử dụng cặp mồi Pan-Flavivirus (MAMD/cFD2) trong phản ứng RT-PCR để sàng lọc Flavivirus trên các loài *Ph. sp.* Kết quả của nghiên cứu này thể hiện trong hình 1.7 [78].

4.2.3. Một số đặc điểm của Flavivirus trên các loài muỗi cát cái

Phát hiện thấy dấu vết DEN2 trên muỗi cát cái thuộc giống *Sergentomyia* ở Việt Nam của chúng tôi chưa đủ để khẳng định việc chúng có truyền loại vi rút này hay không. Tuy nhiên trong tương lai giống *Sergentomyia* nói chung và 2 loài *Segentomyia (Parrotomyia) barraudi group* và *Segentomyia sp2* cần được nghiên cứu thêm để tìm hiểu vai trò của chúng trong việc truyền Flavivirus đặc biệt là Dengue týp 2.

Xem xét các nghiên cứu trên thế giới đã công bố về việc sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát, chúng tôi thấy các nghiên cứu này đều chỉ ra vai trò của muỗi cát *Phlebotomus* trong việc truyền vi rút nhóm này. Nhưng tới nay, chúng tôi chưa tìm thấy một bằng chứng chắc chắn nào ở Việt Nam về việc muỗi cát thuộc giống *Phlebotomus* nhiễm Flavivirus. Do vậy, trong những nghiên cứu tiếp theo với cỡ

mẫu lớn hơn có thể có câu trả lời chính xác và đầy đủ vai trò của giồng này trong việc truyền Flavivirus.

Ninh Bình, Lạng Sơn là 2 tỉnh tìm thấy bằng chứng Flavivirus trên muỗi cát trong khi đó 4 tỉnh khác là Sơn La, Quảng Ninh, Hà Giang và Lào Cai chưa tìm thấy bằng chứng này. Trong bối cảnh một số tỉnh như Sơn La là nơi có báo cáo ca mắc liên quan đến Flavivirus như viêm não không rõ nguyên nhân hay tình hình sốt xuất huyết đang gia tăng đột biến tại các tỉnh trước đây chưa có ca bệnh. Việc tìm hiểu rõ và phát hiện vai trò của các véc tơ truyền bệnh mới như nghiên cứu này cần được tăng cường về quy mô cũng như kỹ thuật xét nghiệm nhằm mang lại những kết quả hữu ích cho công tác phòng chống dịch bệnh.

Hạn chế trong nghiên cứu là những mẫu có ARN DEN2 không đủ thể tích để thực hiện phân lập vi rút, tiến hành những phân tích sâu hơn cung cấp dữ liệu cho thấy Flavivirus có thể được truyền qua muỗi cát ở Việt Nam.

4.3. THỰC TRẠNG NHIỄM LEISHMANIA Ở MUỖI CÁT TẠI ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU VÀ NGUY CƠ LÂY TRUYỀN SANG NGƯỜI

4.3.1. Leishmania xác định được tại Quảng Ninh

Bệnh Leishmaniasis nội tạng trên người lần đầu được báo cáo vào năm 2000 tại tỉnh Quảng Ninh [12]. Những trường hợp này đặt ra câu hỏi về sự lây truyền Leishmania địa phương ở Việt Nam. Mẫu thu thập từ một bệnh nhân ở Quảng Ninh được Viện liên quốc gia Queensland, Brisbane, Australia xác định là *Leishmania infantum* hoặc *L. donovani*.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc được 1 mẫu *Leishmania sp.* từ cá thể muỗi cát bắt tại một hang đá gần với vị trí nhà bệnh nhân ghi nhận năm 2000. Kết quả giải trình tự gen của chủng Leishmania trong nghiên cứu đã xác định có trình tự tương đồng 99,89% với *L. infantum* hoặc *L. donovani* (Hình 3.9). Điều này hoàn toàn tương đồng với kết quả phân lập từ bệnh nhân của Viện liên quốc gia Queensland, Brisbane, Australia. Điều đáng tiếc là tiêu bản muỗi cát cái của mẫu vật này không cho ra được thông tin của loài cụ thể. Khi tra cứu lại bẫy đặt thu thập lúc đó chúng tôi thấy rằng bẫy bắt được 24 cá thể muỗi cát: 8 con là *Se. barraudi group*; 1 *Chinius junlianensis*; 8 *Ph. mascomai*; 2 *Ph. stantoni*; 2 *Se. sylvatica*; 2

Ph. yunshengensis và 1 cá thể không xác định - NA. Hơn nữa, đối chiếu kết quả thu thập muỗi cát năm 2001 tại nhà bệnh nhân được chẩn đoán mắc *Leishmania* chúng tôi cũng thấy ở đó cũng từng ghi nhận sự có mặt của *Ph. stantoni* [12].

Tổng hợp tất cả dữ liệu côn trùng của sáu tỉnh phía Bắc, trong số 2585 mẫu vật, chỉ có 46 mẫu vật được tìm thấy trong nhà hoặc trong chuồng chó. Loài chính được tìm thấy trong các môi trường này là *Ph. stantoni* (18/46 - 39,13%). Loài này ít được nghiên cứu và chưa bao giờ được mô tả là véc tơ của *Leishmania*. Tuy nhiên, kết quả hai bài báo ở Thái Lan cho thấy rằng có dấu vết máu người và ADN của *Trypanosoma* được phát hiện trong *Ph. stantoni*, nghi ngờ khả năng loài này sẽ trở thành véc tơ truyền *Leishmania* [133, 160].

Một số yếu tố khác trong trường hợp phát hiện *Leishmania sp.* tại Quảng Ninh:

- Thứ nhất: tại địa bàn thu mẫu, Quảng Ninh có biên giới tiếp giáp với Trung Quốc, nơi có báo cáo ca bệnh *Leishmaniasis* thể nội tạng trên chó thể nhiễm *L. infantum* và cả trên người thể nhiễm *L. donovani* [109].

- Thứ 2: các bệnh nhân nhiễm *Leishmania* ở Quảng Ninh trước đây được ghi nhận hội chứng suy giảm miễn dịch do đồng nhiễm HIV, trường hợp này giống với báo cáo ca bệnh tại Quảng Bình năm 2018 [132].

- Thứ 3: các véc tơ và tác nhân *Leishmania* gây bệnh được thu thập gần với nhà bệnh nhân năm 2001.

Chúng tôi nhận thấy sau 15 năm kể từ năm 2001 khi báo cáo tìm thấy *Leishmania* trên bệnh nhân đến năm 2016, chủng *Leishmania* trên muỗi cát tại tổ 4 phường Quang Hanh, thành phố Cẩm Phả, tỉnh Quảng Ninh mặc dù có mặt của muỗi cát, có sự hiện diện của tác nhân gây bệnh thể VL cả trên người và véc tơ đồng thời tiếp giáp với Trung Quốc nơi có báo cáo ca bệnh *Leishmaniasis* thể nội tạng trên chó thể nhiễm *L. infantum* và cả trên người thể nhiễm *L. donovani* [109] nhưng lại hoàn toàn không thấy báo cáo ca bệnh mới nào. Điều này đặt ra một câu hỏi là tại sao lại như vậy? Phải chăng do hệ thống giám sát ca bệnh tại địa phương chưa đủ năng lực phát hiện ra hay về bản chất tác nhân gây bệnh này có điều gì đặc biệt.

Mặt khác, khi phân tích trình tự gen của chủng *Leishmania sp.* chúng tôi tìm thấy được một chuỗi trình tự dài 907 bp tương đồng tới 99.89% (906/907 nucleotide) so với hai chủng *L. donovani* CP022642.1 và *L. infantum* LR812960.1, sự sai khác duy nhất là vị trí axit amin T147C (Hình 3.10 và 3.11). Điều trùng hợp là mặc dù 2 chủng *L. donovani* CP022642.1 và *L. infantum* LR812960.1 có kích thước đoạn gen khá lớn tương ứng 1159 kb và 1175 kb nhưng vị trí từ 251340 đến 252246 của chủng *L. donovani* CP022642.1 tương đồng 100% với vị trí từ 268402 đến 268948 của chủng *L. infantum* LR812960.1. Chính điều này khiến cho chúng tôi không định danh chính xác được chủng phân lập trong nghiên cứu và điều này giống với kết quả công bố năm 2001 của Viện liên quốc gia Queensland, Brisbane, Australia về xác định *Leishmania* của mẫu phân lập trên bệnh nhân [12].

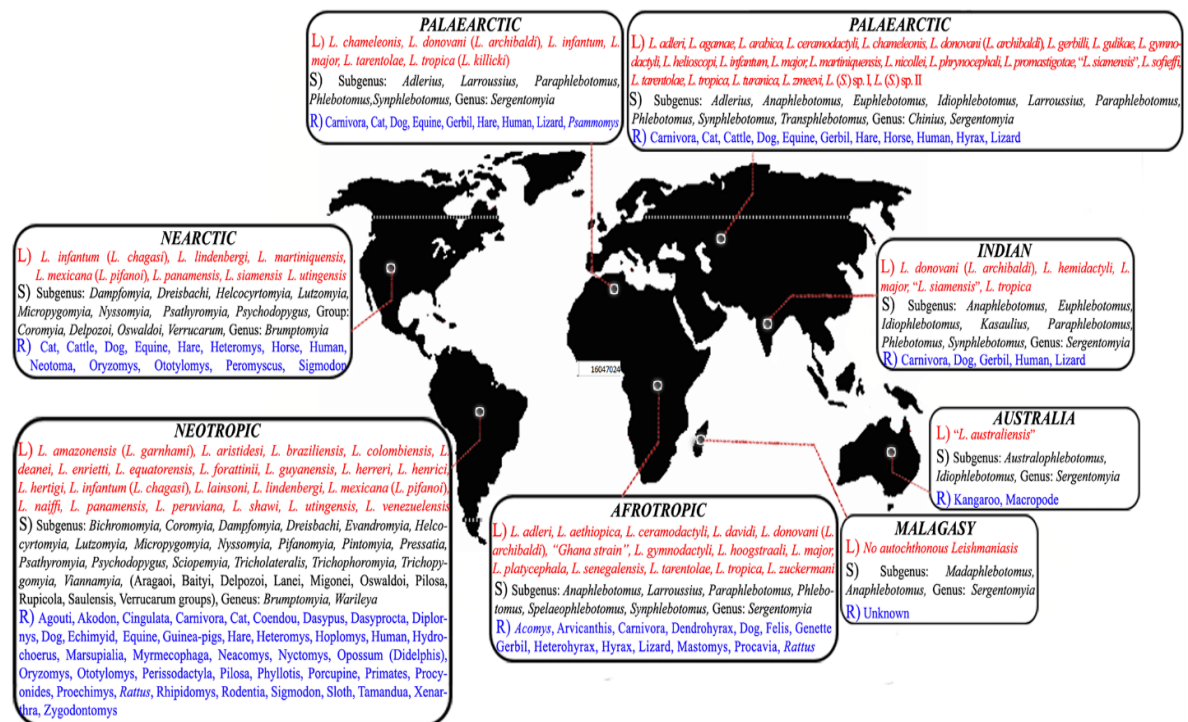
Tăng số mẫu so sánh, chúng tôi tiếp tục tiến hành so sánh với chủng *Leishmania chagasi* CP048191.1, *Leishmania infantum* FR796459.1 và một số chủng khác. Đặc điểm chung của các chủng này là đều gây ra bệnh thể VL, tuy nhiên đối tượng là khác nhau, một số chủng phân lập trên chó, một số chủng phân lập trên người. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen trên chủng *Leishmania* xác định được tại Quảng Ninh là một đoạn gen chung của tất cả các chủng này. Mặt khác, khi so sánh với các chủng *Leishmania* khác như *L. tropica* hay *L. major* (thể da) chúng tôi không thấy sự tương đồng trong các trình tự gen so sánh. Điều này giúp chúng tôi hướng đến chủng *Leishmania* xác định được ở Quảng Ninh là một chủng gây ra bệnh thể nội tạng.

Kết hợp với thông tin bệnh nhân bị suy giảm miễn dịch nên làm giảm khả năng đặc hiệu của chủng nhiễm, hay nói cách khác có thể bị lây nhiễm các tác nhân mà trước đây chỉ lưu hành trên động vật, chúng tôi đặt ra giả thuyết rằng chủng *Leishmania sp.* thu thập trên muỗi cát ở Quảng Ninh là nguyên thủy hơn so với các chủng gây bệnh khác phân lập được trên chó hoặc người. Nhiều khả năng xem xét ở mức độ phát sinh loài thì các chủng *Leishmania* gây bệnh VL xuất hiện trên muỗi cát trước, sau đó mới phân hoá thành các chủng khác gây bệnh trên động vật và người tùy theo điều kiện thực tế. Điều này cũng đã được đề cập đến trong bài báo tổng hợp các nghiên cứu về *Leishmania* và muỗi cát của M. Akhoundi và cộng sự

năm 2016 [29]. Giả thuyết này giải thích một phần việc định danh chủng của chúng tôi ở giữa 2 loài *L. donovani* hoặc *L. infantum*, và khoảng thời gian dài không có ca bệnh VL mới trên người tại địa bàn nghiên cứu. Tuy nhiên, đây mới là giả thuyết ban đầu và cần rất nhiều nghiên cứu tiếp theo để khẳng định, chúng tôi mong muốn trong tương lai sẽ có nhiều nhà khoa học trong và ngoài nước cùng nghiên cứu lĩnh vực này để đưa ra các bằng chứng chính xác trả lời cho câu hỏi giả thuyết này là đúng hay sai.

4.3.2. Leishmania xác định được tại Sơn La

Thông thường *Leishmania infantum* được nhắc đến như một tác nhân gây bệnh Leishmaniasis thể nội tạng trên chó. Bệnh ghi nhận ở Châu Âu, Châu Mỹ, Châu Phi, Trung Á, Đông Á (Hình 4.7) [29, 182]. Ở Trung Quốc, véc tơ truyền *Leishmania infantum* ghi nhận là *Ph. chinensis*, *Ph. alexandri*, *Ph. wui*, *Ph. kiangsuensis* còn các nước khác ghi nhận véc tơ truyền bệnh đều thuộc giống *Phlebotomus*. Sơn La trong nghiên cứu này là một tỉnh miền núi lần đầu tiên ghi nhận *Leishmania infantum* trên muỗi cát thuộc giống *Phlebotomus* thu thập được trong chuồng lợn. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây.



Hình 4.5. Sự phân bố địa lý của véc tơ muỗi cát trên thế giới theo các loài *Leishmania* và ổ chứa động vật ở Cựu và Tân Thế giới [29].

Trong mẫu *Leishmania* dương tính của Sơn La chúng tôi phát hiện thấy 7 trình tự gen tương đồng với 8 class (class 13, 16, 18, 25, 31, 38, 39 và 50) trên minicircle kinetoplas của các chủng *Leishmania infantum* đã công bố. Điều này cho thấy sự phức tạp trong cấu trúc di truyền của nhóm ký sinh trùng này. Các gen vòng trên các kinetoplas có độ lặp cao, phân hoá nhiều lớp, nếu không sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen NSG thì rất khó có thể phân tích và tách biệt được những đoạn lặp này (Bảng 3.9).

Ở Sơn La chúng tôi ghi nhận 3 loài muỗi thuộc giống *Phlebotomus* trong đó loài *Ph. stantoni* (n=37) chiếm ưu thế nhất trong số những loài này, *Ph. betisi* (n=5) và *Ph. mascomai* (n=1). Tại thời điểm thu mẫu có 4 cá thể muỗi cát, 3 trong số đó thuộc giống *Sergentomyia* bao gồm 1 cá thể thuộc loài *Se. hivernus* và 2 cá thể thuộc *Se. barraudi*. Duy nhất 1 cá thể *Ph. sp* thì sàng lọc được *Leishmania infantum*.

4.3.3. *Leishmania* xác định được tại Ninh Bình

Như đã mô tả ở trên, tại sáu tỉnh được nghiên cứu, phần lớn các mẫu muỗi cát được thu thập trong môi trường hang và đặc biệt là các “ổ bánh mỳ”, cho thấy sự ưa thích nhiệt đới đối với các loài động vật hoang dã có hang, như dơi (Bảng 3.3). Những ổ bánh mỳ thường được bao quanh bởi những ngôi nhà ở ngoại vi của các thị trấn hoặc làng mạc hoặc trong môi trường nông thôn. Điều này cho thấy có thể có sự tiếp xúc giữa muỗi cát trong hang với con người và động vật nuôi. Chúng minh bằng thực tế là tất cả các loài được xác định (bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*) đều được tìm thấy trong hang động và ngoài trời, trong khi tính đa dạng của loài thấp hơn nhiều trong nhà và trong chuồng động vật (từ 15 loài khác nhau trong hang động đến 5 loài ở chó và chuồng lợn). Tuy nhiên, tại Ninh Bình, việc 1 cá thể *Se. sp2* bắt được ở sinh cảnh ngoài nhà nhiễm *Leishmania infantum* cho thấy nguy cơ về việc có thể lây truyền bệnh Leishmaniasis cho người hoặc vật nuôi như chó hoặc mèo. *Leishmania infantum* là một trong những chủng chính gây nên bệnh Leishmaniasis thể nội tạng, trong tất cả các nghiên cứu trước đây chỉ ghi nhận các loài muỗi thuộc giống *Phlebotomus* là véc tơ truyền [182]. Việc phát hiện ra *Leishmania infantum* trên *Sergentomyia sp2* là một phát hiện rất mới.

Tương tự như chúng ở Sơn La, trong mẫu *Leishmania* chúng tôi thu thập ở Ninh Bình cho thấy 2 trình tự tương đồng với các trình tự của các chủng *Leishmania infantum* đã công bố trên class 16 và 25 thuộc minicircle kinetoplas.

Tuy rằng với những dữ liệu này chưa đủ để kết luận *Se. sp2* là véc tơ truyền *L. infantum* nhưng phát hiện này lần đầu tiên khẳng định sự có mặt của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát tại Việt Nam, hơn nữa là một chủng gây bệnh thể nội tạng rất nguy hiểm. Muỗi cát giống *Sergentomyia* từ trước tới nay chưa được ghi nhận truyền *Leishmania* [29] nên những hiểu biết về chúng còn nhiều hạn chế. Với kết quả của đề tài, chúng tôi nghĩ nên tăng thêm vai trò của véc tơ truyền bệnh của giống *Sergentomyia* và nên đưa vào giám sát để làm rõ vai trò truyền bệnh của giống *Sergentomyia* nói chung và loài *Se. sp2* nói riêng. Một số nghiên cứu cho rằng các loài muỗi cát *Sergentomyia* có thể truyền bệnh *Leishmania* [23, 110, 156]. Gần đây, dữ liệu được công bố bởi Srisuton và cộng sự [165] chỉ ra rằng một số loài muỗi cát có thể là vật trung gian tiềm ẩn của ký sinh trùng *Leishmania* và *Trypanosoma* ở miền Nam Thái Lan. Vì vậy, muỗi cát và ổ sinh thái liên quan cần được nghiên cứu thêm. Ở Việt Nam, *Leishmania* có thể được truyền bởi muỗi cát và sự lây truyền này có thể xảy ra trong các hang động mà con người thường xuyên lui tới. Tất cả những khía cạnh này nhấn mạnh sự cần thiết phải nghiên cứu sâu hơn các quần thể muỗi cát ở Việt Nam để xác định véc tơ và vị trí lây truyền bệnh *Leishmaniasis*.

Hạn chế của nghiên cứu

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi phát hiện 2 loài muỗi cát mới là *Se. sp2* và *Se. sp3*. Hiện tại, chúng tôi đang thu thập thêm các thông tin liên quan đồng thời kết hợp với các chuyên gia về muỗi cát trong và ngoài nước để khẳng định.

Việc tìm thấy dấu vết của *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái ở Việt Nam là một phát hiện rất mới. Tuy nhiên, điều này vẫn chưa chứng minh được vai trò truyền ký sinh trùng *Leishmania* của các loài muỗi cát ở Việt Nam, còn thiếu rất nhiều bằng chứng cần bổ sung như khả năng lây truyền, sự nhân lên của vi rút trong cơ thể các loài muỗi cát đó. Trong tương lai, khi có thể nuôi, nhân dòng được các

loài muỗi cát, phân lập được các chủng leishmania gây bệnh, chúng tôi hy vọng sẽ cung cấp thông tin đầy đủ hơn về vai trò truyền bệnh của véc tơ này ở Việt Nam.

So sánh với các nghiên cứu khác công bố phát hiện ra Flavivirus trên muỗi cát, các nghiên cứu đó đã tiến hành phân lập được các chủng vi rút, cho phép thu nhận được trình tự các đoạn gen của vi rút hoàn chỉnh hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi không tiến hành phân lập, do vậy các kết quả chỉ dừng lại ở mức độ ghi nhận dấu vết có Flavivirus trên mẫu muỗi cát cái thu thập được. Mặt khác, một số nghiên cứu trên thế giới cho thấy rằng các cá thể muỗi cát đực cũng có khả năng bị nhiễm Flavivirus, trong nghiên cứu này chúng tôi mới thực hiện sàng lọc trên các muỗi cát cái. Do vậy, với các nghiên cứu sau này chúng tôi sẽ có thể tiến hành trên cả các mẫu muỗi cát đực.

KẾT LUẬN

1. Thành phần loài và một số đặc điểm phân bố của muỗi cát tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam, 2016-2018

Tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam đã thu thập được 2585 con muỗi cát, trong đó có 1511 con đực (58,5%) và 1049 con cái (40,6%), ghi nhận 5 giống muỗi cát: *Sergentomyia* (n=2067, 79,96%) chiếm tỷ lệ cao nhất, *Phlebotomus* (n=340, 13,15%), *Chinius* (n=31, 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14, 0,54%) và *Grassomyia* (n=6, 0,23%).

Tổng số 15 loài muỗi cát được ghi nhận, trong đó có 13 loài muỗi cát được định danh:

- *Sergentomyia* có 7 loài *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *brevicaulis* group, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *barraudi* group, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *bailyi*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *hivernus*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *perturbans*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *khawi*;
- *Grassomyia* có 1 loài *Grassomyia indica*;
- *Phlebotomus* có 4 loài *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*) *stantoni*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *yunshengensis*, *Phlebotomus* (*Larroussius*) *betisi*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *mascomai*;
- *Chinius* có 1 loài [*Chinius junlianensis*];

Muỗi cát chưa định danh có 2 loài là *Sergentomyia* sp2. và *Sergentomyia* sp3. Muỗi cát ghi nhận có mặt ở tất cả các sinh cảnh bao gồm: trong nhà (n=30), ngoài nhà (n=936), trong chuồng gia súc (n=65), gia cầm (n=66), chuồng lợn (n=41), chuồng chó (n=16) và hang động (n=1431). Muỗi cát chủ yếu được thu thập trong các hang động. Độ phong phú loài cao nhất là ở hang và sinh cảnh ngoài nhà SR=15 (bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3*).

2. Thực trạng nhiễm Flavivirus ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

Tỉ lệ muỗi cát cái mang ARN của vi rút DEN2 trong nghiên cứu là 0,198% (n=2).

Mẫu muỗi cái mang ARN của vi rút DEN2 đầu tiên thu thập ngày 28/06/2016 Ninh Bình, được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* thu thập trong hang đá.

Mẫu muỗi cái mang ARN của vi rút DEN2 thứ 2 thu thập ngày 03/8/2016 Lạng Sơn, được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia barradi* thu thập ở sinh cảnh trong hang đá.

3. Thực trạng nhiễm Leishmania ở muỗi cát tại địa điểm nghiên cứu

Leishmania được xác định trên quần thể muỗi cát cái ở 3 tỉnh là Sơn La, Quảng Ninh và Ninh Bình. Tỷ lệ nhiễm Leishmania nhiễm trên quần thể muỗi cát cái nghiên cứu là 3/1009 cá thể (0,297%).

Mẫu Leishmania đầu tiên chưa khẳng định được loài, thu thập ngày 01/06/2016 tại Quảng Ninh, được sàng lọc trên muỗi cát cái thu thập trong hang đá.

Mẫu Leishmania thứ 2 được khẳng định là *Leishmania infantum*, thu thập ngày 28/6/2016 tại Ninh Bình, được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* thu thập ở sinh cảnh ngoài nhà.

Mẫu Leishmania thứ 3 cũng đã được khẳng định là *Leishmania infantum*, thu thập ngày 10/10/2016 tại Sơn La, được sàng lọc trên muỗi cát cái thuộc giống *Phlebotomus* thu thập ở trong chuồng lợn.

KHUYẾN NGHỊ

1. Tăng cường thêm các cuộc điều tra thu thập muỗi cát tại các tỉnh khác để có thêm số liệu so sánh với kết quả của nghiên cứu.
2. Tiếp tục và mở rộng các nghiên cứu về hình thái học và sinh học phân tử để định loại chính xác các véc tơ muỗi các truyền bệnh và làm rõ thêm vai trò của các tác nhân gây bệnh như Flavivirus đặc biệt là DEN2 và Leishmania trên muỗi cát để có bức tranh tổng thể và toàn diện hơn.
3. Mở rộng triển khai nghiên cứu về tập tính, sinh học sinh thái của muỗi cát trong các sinh cảnh gần người để có các biện pháp phòng chống chủ động trong bối cảnh tìm thấy ARN của DEN2 và Leishmania trên các cá thể muỗi cát cái.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ

1. Vu SN, Tran HS, Tran VP, Tran CT, Tran ND, Dang DA, Nguyen TY, Vu TL, Ngo KP, Nguyen VH, Hoàng NA, Cassan C, Prudhomme J, Depaquit J, Rahola N, Bañuls AL (2021), “axonomical insights and ecology of sandfly (Diptera, Psychodidae) species in six provinces of Northern Vietnam”, *Parasite*. 2021;28:85. doi: 10.1051/parasite/2021080. Epub 2021 Dec 17. PMID: 34928207; PMCID: PMC8686828.

2. Trần Hải Sơn, Nguyễn Lê Khánh Hằng, Trần Vũ Phong, Trần Công Tú, Nguyễn Việt Hoàng, Vũ Thị Liễu, Nguyễn Thị Yên, Úng Thị Hồng Trang, Vũ Sinh Nam (2022), “Thực trạng nhiễm *Leishmania* trên quần thể muỗi cát cái thu thập tại 6 tỉnh miền bắc việt nam, 2016”, *Tạp chí Y học dự phòng tập 32, số 8 năm 2022*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Phạm Nhật An (2016), *Bệnh viêm não trẻ em*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
2. Bộ Y Tế (2011), "Hướng dẫn chẩn đoán, điều trị sốt xuất huyết dengue (Ban hành kèm theo Quyết định số 458/QĐ-BYT ngày 16/2/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế)".
3. Bộ Y Tế (2011), *Hướng dẫn giám sát và phòng chống sốt xuất huyết* (Ban hành kèm theo Quyết định số 1499/QĐ-BYT ngày 17/5/2011 của Bộ trưởng Bộ Y tế).
4. Bộ Y Tế (2017), *Niên giám thống kê bệnh truyền nhiễm 1999 – 2016 – Bệnh viêm não vi rút*, Nhà xuất bản Y học, tr. 949.
5. Bộ Y tế (2018), *Niên giám thống kê Bệnh truyền nhiễm 1995-2017 - Bệnh viêm não Vi rút*, Nhà xuất bản Y học, tr. 277.
6. Nguyễn Văn Châu và Nguyễn Văn Đê (2005), "Kết quả bước đầu điều tra dịch tễ bệnh trùng roi đường máu Leishmania tại Quảng Ninh trong năm 2002-2003", *Tạp chí Phòng chống bệnh Sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, Số 3, tr. 84-91.
7. Bùi Đại, Nguyễn Văn Mùi Nguyễn Hoàng Tuấn, Phan Xuân Phương, Từ Văn Thơ (2002), "Bệnh học truyền nhiễm", *Nhà xuất bản Y học*, tr. 432.
8. Dự án phòng chống SXHD quốc gia (1999 - 2012), *Báo cáo công tác phòng chống SXHD các năm, giai đoạn 1999 - 2012*.
9. Đặng Thị Ánh Duyên và các cộng sự (2015), "Một số đặc điểm dịch Viêm não Nhật Bản tại Sơn La năm 2014", *Tạp chí Y học dự phòng*, Số XXV, tr. 179-195.
10. Trần Như Dương và các cộng sự (2021), *Giám sát và phòng chống Côn trùng và Động vật y học của một số bệnh phổ biến ở người*, Nhà xuất bản Y học.
11. Đỗ Quang Hà và Trần Văn Tiến (1984), "Dịch Dengue xuất hiện tại Việt Nam từ 1975-1983", *Tạp chí Y học Việt Nam*, Số 3, tr. 28-40.
12. Lê Thanh Hòa và các cộng sự (2001), "Kết quả sơ bộ về sinh bệnh học của bệnh KALA-AZAR theo báo cáo của Bộ y tế Việt Nam", *Tạp chí Phòng chống các bệnh Sốt rét và Ký sinh trùng*, Số 4.
13. Vũ Sinh Nam, Trần Đắc Phu, Vũ Hữu Việt, Đỗ Đức Lưu (2011), "Một số đặc điểm dịch tễ học bệnh sốt Dengue/sốt xuất huyết Dengue tại Nam Hà, 1991-2000", *Tạp chí Y học thực hành*, Số 5, tr. 16-21.
14. Nguyễn Thị Kim Tiên (2010), *Giám sát và phòng chống dịch sốt dengue và sốt dengue xuất huyết*, Nhà xuất bản Y học - Hà Nội.

Tài liệu tiếng Pháp

15. Emile Abonnenc (1972), *Les phlébotomes de la région éthiopienne (Diptera, Psychodidae)*.
16. J.M.F. Bigot (1854), "Essai d'une classification générale et synoptique de l'ordre des insectes diptères (3ème mémoire). Tribu de Tipulidii (mihi). In, " *Annales de la Société entomologique de France* (3) 2.

17. EAB Galati, EF Rangel., FIOCRUZ Lainson, Río de (2014), "Classificação, morfologia, terminologia e identificação de Adultos: Bioecologia e Identificação de Phlebotominae", *Flebotomíneos do Brasil* tr. 367.
18. Eunice Aparecida Bianchi Galati (2003), "Classificação de phlebotominae", *Flebotomíneos no Brasil*, pp. 23-52.
19. N Léger, J Depaquit and Vincent (2005), "les phlébotomes de madagascar (Diptera: Psychodidae). iv-description de *Sergentomyia (rondanomyia) goodmani* n. sp. rétablissement du sous-genre *Rondanomyia theodor*". *Parasite Robert* 12(1), pp. 51-57.
20. J Raynal (1935), *Contribution à l'étude des phlébotomes d'Indochine*. Arch. Inst. Pasteur Indochine, 19, pp. 237-292.
21. J Raynal and H. Gaschen (1935), *Sur les phlébotomes d'Indochine. IX. Phlebotomus sylvaticus n. sp.* Bull. Soc. Path. Ex. 28, pp. 592-601.
22. J Raynal and H Gaschen (1935), "Sur les phlébotomes d'Indochine. V. Présence de *Phlebotomus barraudi*, Sinton 1929, dans le Haut-Bassin du Fleuve-Rouge et description de *Phlebotomus barraudi* cr", *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. 28, pp. 117-118.
23. J Raynal (1936), "Sur une nouvelle espèce de phlebotome du nord de la Chine: *Phlebotomus khawi* n. sp". *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 14(6), pp. 529-540.
24. Aurélie Thai (2004), *Contribution à la connaissance des phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Vietnam*.

Tài liệu tiếng Anh

25. Public Health Laboratory Network (PHLN) (2022), *Flavivirus – laboratory case definition*. Canberra: PHLN, 2022.
26. Emily R Adams et all. (2012), *Leishmaniasis direct agglutination test: using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy*. 6(12), pp. e1946.
27. Amir Ahmad Akhavan et all. (2010), *Leishmania species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs*. 126(4), pp. 552-556.
28. M. Akhouni et all. (2017), "Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis", *Mol Aspects Med*. 57, pp. 1-29.
29. M. Akhouni et all. (2016), "A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies", *PLoS Negl Trop Dis*. 10(3), pp. e0004349.
30. Mohammad Akhouni et all. (2013), *Molecular characterization of Leishmania spp. in reservoir hosts in endemic foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran*. 60(3), pp. 218.
31. Benjamin M Akiyama et all. (2016), "Zika virus produces noncoding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease", *Science*. 354(6316), pp. 1148-1152.

32. Juan D Alfonzo, Otavio Thiemann and Larry (1997), "The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria". *Nucleic Acids Research Simpson*. 25(19), pp. 3571-3759.
33. Cigdem Alkan et all. (2015), "Ecuador Paraiso Escondido Virus, a New Flavivirus Isolated from New World Sand Flies in Ecuador, Is the First Representative of a Novel Clade in the Genus Flavivirus", *Journal of Virology*. 89(23), pp. 11773-11785.
34. J. Alvar et all. (2012), "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence", *PLoS One*. 7(5), pp. e35671.
35. Chamnarn Apiwathnasorn et all. (2011), "Cavernicolous species of phlebotomine sand flies from Kanchanaburi Province, with an updated species list for Thailand", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(6), pp. 1405-1409.
36. AM Aransay et all. (2000), "Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA", *Insect Molecular Biology*. 9(2), pp. 157-168.
37. Kifaya Azmi et all. (2010), *Identification of Old World Leishmania species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay*. 15(8), pp. 872-880.
38. Y Ba et all. (1999), "Phlebotomus of Senegal: survey of the fauna in the region of Kedougou. Isolation of arbovirus", *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* (1990). 92(2), pp. 131-135.
39. DC Barker (1987), "DNA diagnosis of human leishmaniasis". *Parasitology Today*. 3(6), pp. 177-184.
40. Frank L Basiye et all. (2010), "Sensitivity and specificity of the Leishmania OligoC-TesT and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya". 15(7), pp. 806-810.
41. Esther Bensoussan et all. (2006), "Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis". 44(4), pp. 1435-1439.
42. Stephen M (1988), "Characterization of the 'unusual' mobility of large circular DNAs in pulsed field-gradient electrophoresis". *Nucleic acids research Beverley*. 16(3), pp. 925-939.
43. Bradley J. Blitvich and Andrew E. Firth (2015), "Insect-Specific Flaviviruses: A Systematic Review of Their Discovery, Host Range, Mode of Transmission, Superinfection Exclusion Potential and Genomic Organization", *Viruses*. 7(4), pp. 1927-1959.
44. Constança Britto et all. (1998), "Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes". 222(1), pp. 107-117.
45. Grant L Campbell et all. (2011), "Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review", *Bulletin of the World Health Organization*. 89(10), pp. 766-774.
46. Cinzia Cantacessi et all. (2015), "The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics". 31(3), pp. 100-108.

47. G.M.L. Carvalho et al. (2017), "Molecular Detection of Leishmania DNA in Wild-Caught Phlebotomine Sand Flies (Diptera: Psychodidae) From a Cave in the State of Minas Gerais, Brazil", *Med Entomol.* 54(1), pp. 196-203.
48. JJ Castilla et al. (1995), "*Leishmania donovani*: In vitro culture and [1 H] NMR characterization of amastigote-like forms". 142(2), pp. 89-97.
49. Marcello Ceccarelli et al. (2014), "Detection and characterization of Leishmania (*Leishmania*) and Leishmania (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA". 9(2), pp. e88845.
50. Thomas J Chambers et al. (1990), "Flavivirus genome organization, expression, and replication", *Annual review of microbiology.* 44(1), pp. 649-688.
51. Mary B. Crabtree, Phan T. Nga and Barry R. Miller (2009), "Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus, from Vietnam", *Archives of Virology.* 154(5), pp. 857-860.
52. Elisa Cupolillo et al. (1995), "Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania". 73(1-2), pp. 145-155.
53. MRB Da Silva et al. (2015), "Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva".
54. Simonne De Doncker et al. (2005), "A new PCR—ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects". 99(1), pp. 25-31.
55. JCH De Meijere (1909), *Blutsaugende micro-dipteren aus Niederländisch ostindien.*
56. Daniela de Pita-Pereira et al. (2008), "Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay". 107(1), pp. 66-69.
57. J Depaquit et al. (2007), *Chinius junlianensis* Leng 1987 (Diptera: Psychodidae): new morphological data. 101(2), pp. 181-184.
58. Anna Dostálová and Petr Volf (2012), "Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview", *Parasites vectors.* 5(1), pp. 1-12.
59. Tim Downing et al. (2012), "Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the *Leishmania donovani* species complex". 12(1), pp. 149-159.
60. V. Duong, P. Dussart and P. Buchy (2017), "Zika virus in Asia", *Int J Infect Dis.* 54, pp. 121-128.
61. A Dweik et al. (2007), "Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and Hae III) for the detection of Leishmania species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material". 101(5), pp. 399-407.

62. S Esseghir, PD Ready and R Ben-Ismaïl (2000), "Speciation of Phlebotomus sandflies of the subgenus Larrousius coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion", *Biological Journal of the Linnean Society*. 70(2), pp. 189-219.
63. Gamou Fall et al. (2021), "First Detection of the West Nile Virus Koutango Lineage in Sandflies in Niger", *Pathogens*. 10(3), pp. 257.
64. Octavio Fernandes et al. (1994), "Mini-exon gene variation in human pathogenic Leishmania species". 66(2), pp. 261-271.
65. Fabiano B Figueiredo et al. (2010), "Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples". 52(4), pp. 193-196.
66. Eunice AB Galati et al. (2017), "An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae)". 24.
67. Jean-Pierre Gangneux et al. (2003), "Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections in an area of nonendemicity". 41(4), pp. 1419-1422.
68. Leslie S Gay et al. (1996), "The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*". 77(2), pp. 193-200.
69. Mehrdad Ghasemian et al. (2014), "Development and assessment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Iran". 9(1), pp. 50.
70. Cely Cristina Martins Gonçalves et al. (2002), "Evaluation of antigens from various Leishmania species in a Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis". 66(1), pp. 91-102.
71. Laetitia Ninove, Gregory Moureau, Arezki Izri, Shelley Cook, Xavier De Lamballerie, Remi N. Charrel (2010), "Flavivirus RNA in Phlebotomine Sandflies", *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 10(2), pp. 195-197.
72. Eva Harris et al. (1998), "Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes". 36(7), pp. 1989-1995.
73. Andrew Haydock et al. (2015), "RNA-seq approaches for determining mRNA abundance in Leishmania", *Parasite Genomics Protocols, Springer*, pp. 207-219.
74. W Hennig (1972), "Insektenfossilien aus der unteren Kreide. IV. Psychodidae (Phlebotominae)", einer kritischen Übersicht über das phylogenetische System der Familie und die bisher beschriebenen Fossilien. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde*. 241, pp. 1-69.
75. Carolina Hernández et al. (2014), "Identification of six New World Leishmania species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay". 7(1), pp. 1-7.
76. Michael R Holbrook (2017), "Historical perspectives on flavivirus research", *Viruses*. 9(5), pp. 97.

77. P. J. Hotez et al. (2004), "Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project", *Clin Infect Dis.* 38(6), pp. 871-8.
78. Mirsada Hukić et al. (2020), "A novel flavivirus strain detected in phlebotomine sandflies in Bosnia and Herzegovina", *Med Glas (Zenica)*. 17(2), pp. 301-307.
79. Andrew P Jackson et al. (2016), "Kinetoplastid phylogenomics reveals the evolutionary innovations associated with the origins of parasitism". 26(2), pp. 161-172.
80. Milan Jirků et al. (2006), "Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*". 55(1), pp. 75-79.
81. H Johnson (1991), "The identification of female sandflies of the subgenus *Larrousius* by the morphology of the spermathecal ducts", *Parassitologia*. 33, pp. 1.
82. Alicia Jorquera et al. (2005), "Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia spp.* captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela". 100(1), pp. 45-48.
83. Shaden Kamhawi et al. (2004), "A role for insect galectins in parasite survival", *Cell*. 119(3), pp. 329-341.
84. Fritz H Kayser et al. (2005), *Medical microbiology*, pp. 493-499.
85. K Kertész et al. (1903), "Katalog der Palaëarktischen Dipteren, vol. 1", Budapest, Hungary (iii + 382 pp).
86. Mohd Shahar Khadri et al. (2008), "First description of the male of *Phlebotomus betisi* Lewis and Wharton, 1963 (Diptera: Psychodidae)". 57(3), pp. 295-299.
87. Jeffrey S Kieft, Jennifer L Rabe and Erich G Chapman (2015), "New hypotheses derived from the structure of a flaviviral Xrn1-resistant RNA: Conservation, folding, and host adaptation", *RNA biology*. 12(11), pp. 1169-1177.
88. R Killick-Kendrick et al. (1986), "The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles".
89. Katrin Kuhls et al. (2007), "Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis". 9(3), pp. 334-343.
90. Katrin Kuhls et al. (2005), "Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex". 7(11-12), pp. 1224-1234.
91. Richard J. Kuhn (2002), "Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion", *Cell*. 108(5), pp. 717-725.
92. Awanish Kumar et al. (2010), "Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing *Leishmania* species of visceral and cutaneous forms". 113(2), pp. 202-206.

93. Laurence Lachaud et al. (2002), "Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis". 40(1), pp. 210-215.
94. Richard P Lane (1993), "sandflies (Phlebotominae)", *Medical insects and arachnids*, Springer, pp. 78-119.
95. N Léger, J Depaquit and F Gay (2010), "*Chinius eunicegalatia* n. sp.(Diptera; Psychodidae), a cavernicolous sandfly from Laos", *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 104(7), pp. 595-600.
96. Nicole Léger, Jérôme Depaquit and Frédérick Gay (2012), "Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n. sp.(Psychodidae; Diptera) from the Philippines", *Pathogens global health*. 106(6), pp. 346-351.
97. Yan Jia Leng (1987), "A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*", *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 81(3), pp. 311-317.
98. D. Lewis (1982), "A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae)", *Bull Brit Mus (Nat Hist)*. 45(2), pp. 121-209.
99. D. Lewis (1987), "Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from the Oriental Region", *Systematic Entomology*. 12, pp. 163-180.
100. D. Lewis (1978), "The Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the Oriental Region", *Bull Br Mus (Natural History)*. 37, pp. 217-343.
101. DJ Lewis and AL Dyce (1988), "Taxonomy of the Australasian Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with revision of genus *Sergentomyia* from the region", *Invertebrate Systematics*. 2(6), pp. 755-804.
102. DJ Lewis et al. (1977), "Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae)", *Systematic Entomology*. 2(4), pp. 319-332.
103. Lixia Li et al. (2012), "Detection of *Leishmania donovani* infection using magnetic beads-based serum peptide profiling by MALDI-TOF MS in mice model". 110(3), pp. 1287-1290.
104. Zhong-Yu Liu et al. (2013), "Novel cis-acting element within the capsid-coding region enhances flavivirus viral-RNA replication by regulating genome cyclization", *Journal of virology*. 87(12), pp. 6804-6818.
105. Elsy Nalleli, Loría-Cervera, Fernando José, São Paulo and Andrade-Narváez (2014), "Animal models for the study of leishmaniasis immunology". *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 56(1), pp. 1-11.
106. J. Lukes et al. (2002), "Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure", *Eukaryot Cell*. 1(4), pp. 495-502.
107. Julius Lukeš, Hassan Hashimi and Alena (2005), "Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates". *Current genetics Zíková*. 48(5), pp. 277-299.
108. Julius Lukeš et al. (2007), "Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(22), pp. 9375-9380.

109. Z. R. Lun et al. (2015), "Visceral Leishmaniasis in China: an Endemic Disease under Control", *Clin Microbiol Rev.* 28(4), pp. 987-1004.
110. C. Maia and J. Depaquit (2016), "Can Sargentomyia (Diptera, Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting Leishmania?", *Parasite.* 23, pp. 55.
111. Francesca Mancianti and N Meciani (1988), "Specific serodiagnosis of canine leishmaniasis by indirect immunofluorescence, indirect hemagglutination, and counterimmunoelectrophoresis". *American journal of veterinary research.* 49(8), pp. 1409-1411.
112. Jutta Marfurt et al. (2003), "Diagnostic genotyping of Old and New World Leishmania species by PCR-RFLP". 46(2), pp. 115-124.
113. Jose María Requena et al. (1997), "Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*". 92(6), pp. 853-858.
114. P Minodier et al. (1997), "Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis". 35(10), pp. 2551-2555.
115. AM Montalvo et al. (2012), "Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification". 31(7), pp. 1453-1461.
116. MA Morales et al. (2001), "Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*". 95(1), pp. 104-107.
117. Javier Moreno and Jorge Alvar (2002), "Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model", *Trends in Parasitology.* 18(9), pp. 399-405.
118. G Moureau et al. (2007), "A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses", *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 7(4), pp. 467-478.
119. Frédérique Muller, Jérôme Depaquit and Nicole Léger (2007), "*Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* n. sp.(Diptera–Psychodidae)". *Parasitology research.* 101(6), pp. 1597-1602.
120. PR Murray, KS Rosenthal and MA Pfaller (2015), *Medical microbiology*: Elsevier health sciences.
121. Abdelmajeed Nasereddin and Charles L Jaffe (2010), "Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene". *Journal of clinical microbiology.* 48(6), pp. 2240-2242.
122. Ho Dang Trung Nghia et al. (2012), "Aetiologies of central nervous system infection in Viet Nam: a prospective provincial hospital-based descriptive surveillance study", *PLoS One.* 7(5), pp. e37825.
123. Harry A Noyes et al. (1998), "A nested-PCR-based schizodeme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan". 36(10), pp. 2877-2881.
124. Judicaël Obame-Nkoghe et al. (2017), "Exploring the diversity of blood-sucking Diptera in caves of Central Africa", *Sci Rep.* 7(1), pp. 250.

125. Samwel Odiwuor et al. (2011), "Leishmania AFLP: paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity". 11(5), pp. 960-967.
126. Fred R Opperdoes et al. (2016), "Comparative metabolism of free-living Bodo saltans and parasitic trypanosomatids". 63(5), pp. 657-678.
127. Tereza C Orlando et al. (2002), "Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting Leishmania: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting Leishmania in the subgenus Leishmania (Leishmania)". 97(5), pp. 695-701.
128. M Paiva-Cavalcanti et al. (2010), "Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review". 16(4), pp. 537-542.
129. WS Patton and Hindle (1926), "The North Chinese species of the genus Phlebotomus. Proc. Roy. Soc (B)", pp. 405-412.
130. Marvin R Paule and Robert J White (2000), "Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III". *Nucleic acids research*. 28(6), pp. 1283-1298.
131. PP J Fauna SSSR Perfil'ev (1968), "Phlebotomidae. Translation of Perfil'ev, 1966 Diptera: Family Phlebotomidae". 93, pp. 1-382.
132. Pham Trung Tien (2018), *a case report of leishmaniasis and HIV coinfection in Hue central hospital*, the 8th asean conference of tropical medicine and parasitology (ACTMP) 2018.
133. Atchara Phumee et al. (2017), "Detection of an Unknown Trypanosoma DNA in a *Phlebotomus stantoni* (Diptera: Psychodidae) Collected From Southern Thailand and Records of New Sand Flies With Reinstatement of *Sergentomyia hivernus* Raynal & Gaschen, 1935 (Diptera: Psychodidae)", *Med Entomol*. 54(2), pp. 429-434.
134. R Piarroux et al. (1993), "Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction". 49(3), pp. 364-369.
135. R Polseela et al. (2011), "Distribution of cave-dwelling phlebotomine sand flies and their nocturnal and diurnal activity in Phitsanulok Province, Thailand", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(6), pp. 1395-1404.
136. Fairchild G. B. and Quate L.W. (1961), *Pacific Insects* 2(3), pp. 203-222.
137. Laurence and Quate L.W. (1962), "A review of the Indo-Chinese Phlebotominae (Diptera: Psychodidae)". *Pacific Insects*. 4(2), pp. 251-267.
138. Anthea Ramos et al. (1996), "Detection and identification of human pathogenic leishmania and trypanosoma species by hybridization of PCR-amplified mini-exon repeats". 82(3), pp. 242-250.
139. Christophe Ravel et al. (2006), "First report of genetic hybrids between two very divergent Leishmania species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*". 36(13), pp. 1383-1388.
140. Dan S Ray (1989), "Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes". *Molecular and Cellular Biology*. 9(3), pp. 1365-1367.

141. PD Ready and B Pesson (1999), *Hybridization, introgression and distribution of vectorial traits*, International Symposium on Phlebotomine Sandflies III.
142. Charles M Rice et al. (1985), "Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution", *Science*. 229(4715), pp. 726-733.
143. JA Rioux et al. (1990), "Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification". 65(3), pp. 111-125.
144. Philippe Rispaill and Nicole Léger (1998), "Numerical Taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae): 2. Restatement of Classification upon Subgeneric Morphological Characters". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93(6), pp. 787-793.
145. Matthew B Rogers et al. (2011), "Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*". 21(12), pp. 2129-2142.
146. Giti Sadeghian et al. (2013), "Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis". 58(3), pp. 239.
147. Jovana Sadlova et al. (2015), "Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: a new laboratory model". 8(1), pp. 1-8.
148. Poonam Salotra et al. (2001), "Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis". 39(3), pp. 849-854.
149. Frederick Sanger et al. (1977), "Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA". 265(5596), pp. 687-695.
150. Natale Scaramozzino et al. (2001), "Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences", *Journal of Clinical microbiology*. 39(5), pp. 1922-1927.
151. Richard Schodde and JH Calaby (1972), "The biogeography of the Australo-Papuan bird and mammal faunas in relation to Torres Strait".
152. Gabriele Schönian et al. (2003), "PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples". 47(1), pp. 349-358.
153. Gabriele Schönian et al. (2001), "Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods". 95(2), pp. 217-224.
154. Laura Schramm and Nouria Hernandez (2002), "Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters", *Genes development*. 16(20), pp. 2593-2620.
155. AK Secombe, Paul Donald Ready and LM Huddleston (1993), "A catalogue of old world phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae)".

156. Massila Wagué Senghor et al. (2016), "Transmission of *Leishmania infantum* in the Canine Leishmaniasis Focus of Mont-Rolland, Senegal: Ecological, Parasitological and Molecular Evidence for a Possible Role of *Sergentomyia* Sand Flies", *PLoS Negl Trop Dis*. 10(11), pp. e0004940.
157. M Khadri Shahar et al. (2011), "Studies of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) populations in limestone areas and caves of western Malaysia", *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(1), pp. 83-93.
158. John Alexander Sinton (1929), "Notes on some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Indian Journal of Medical Research. Part XXIV. *Phlebotomus barraudi* n. sp". 16(3).
159. John Alexander Sinton (1931), "Notes on some Indian Species of the Genus *Phlebotomus*. Part XXVII. *Phlebotomus bailyi* n. sp". *Indian Journal of Medical Research*. 17, pp. 821-829.
160. Suradej Siripattanapipong et al. (2018), "Detection of DNA of *Leishmania siamensis* in *Sergentomyia (Neophlebotomus) iyengari* (Diptera: Psychodidae) and molecular identification of blood meals of sand flies in an affected area, Southern Thailand", *Journal of medical entomology*. 55(5), pp. 1277-1283.
161. AJ Smyth et al. (1992), "Rapid and sensitive detection of leishmania kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients". 105(2), pp. 183-192.
162. Barbara Sollner-Webb and Edward B Mougey (1991), "News from the nucleolus: rRNA gene expression". *Trends in biochemical sciences*. 16, pp. 58-62.
163. Tom Solomon (2004), "Flavivirus encephalitis", *New England Journal of Medicine*. 351(4), pp. 370-378.
164. Manuel Soto et al. (2004), "Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*". 379(3), pp. 617-625.
165. Pimpilad Srisuton and Padet Siriyasatien (2019), *Prevalence of Leishmania and Trypanosoma in sand fly collected in endemic areas of leishmaniasis, Thailand*, Chulalongkorn University.
166. Kenneth D Stuart et al. (2005), "Complex management: RNA editing in trypanosomes". 30(2), pp. 97-105.
167. Nancy R Sturm et al. (2001), "Diplonema spp. possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida". 48(3), pp. 325-331.
168. Nancy R Sturm and Larry Simpson (1991), "Leishmania tarentolae minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region", *Nucleic acids research*. 19(22), pp. 6277-6281.
169. Mei Jean Sue et al. (2014), *Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis*. 2014.

170. Jedsada Sukantamala et al. (2017), "Unexpected diversity of sandflies (Diptera: Psychodidae) in tourist caves in Northern Thailand", *Mitochondrial DNA a DNA Mapp Seq Anal.* 28(6), pp. 949-955.
171. Nishi Suman Gupta (2011), "Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery". *The Indian journal of medical research.* 133(1), pp. 27.
172. Shyam Sundar (2002), "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis". *Clinical Rai and diagnostic laboratory immunology.* 9(5), pp. 951-958.
173. Oskar J Bulletin Theodor (1948), "Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae)", *Entomological Research.* 39(1), pp. 85-115.
174. Michel Tibayrenc et al. (1993), "Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis". 90(4), pp. 1335-1339.
175. Mark Tilgner, Tia S Deas and Pei-Yong Shi (2005), "The flavivirus-conserved penta-nucleotide in the 3' stem-loop of the West Nile virus genome requires a specific sequence and structure for RNA synthesis, but not for viral translation", *Virology.* 331(2), pp. 375-386.
176. Ana Lilia Torres-Machorro et al. (2010), "Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny?". 34(1), pp. 59-86.
177. Silvia RB Uliana et al. (1996), "Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter". 76(1-2), pp. 245-255.
178. GJ Van Eys et al. (1992), "Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of".
179. Petr Volf et al. (2007), "Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids", *International journal for parasitology.* 37(6), pp. 589-593.
180. Tran Hai Son, Vu Sinh Nam, Tran Vu Phong, Tran Cong Tu, Tran Nhu Duong, Dang Duc Anh, Nguyen Thi Yen, Vu Thi Lieu, Ngo Khanh Phuong, Nguyen Viet Hoang, Cécile Cassan, Nguyen Van Chau, Nil Rahola and Anne-Laure Bañuls (2019), *Sand flies, a Potential Vectors of Leishmania in Vietnam*, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. The 1st International Research Forum on Leishmaniasis.
181. Paul Williams (1993), "Relationships of phlebotomine sand flies (Diptera)", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 88(2), pp. 177-183.
182. Regional Office for South-East Asia World Health Organization (2010), "Control of the leishmaniasis", *World Health Organ Tech Rep Ser(949)*, pp. xii-xiii, 1-186, back cover.
183. Regional Office for South-East Asia World Health Organization (2012), Intercountry consultation on elimination of kala-azar in the South-East Asia Region : Kolkata, India, 9-10 November 2011, WHO Regional Office for South-East Asia, New Delhi.

184. Regional Office for the Eastern Mediterranean World Health Organization (2014), *Leishmaniasis*, World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo.
185. Shaofeng Yan et al. (1999), "Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter". 103(2), pp. 197-210.
186. Nguyen Thu Yen et al. (2010), "Surveillance for Japanese encephalitis in Vietnam, 1998–2007", *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 83(4), pp. 816.
187. David G Young and Margo A Duran (1994), *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*, Walter Reed Army Inst of Research Washington DC.
188. David G Young and Phillip G Lawyer (1987), "New World vectors of the leishmaniasis", *Current topics in vector research*, Springer, pp. 29-71.
189. DG Young and PV Perkins (1984), "Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae)", *Mosquito News*. 44(2), pp. 263-304.
190. Adrian M Zelazny et al. (2005), "Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp". 72(4), pp. 415-420.
191. Herve G Zeller (1994), "first isolations of arboviruses from phlebotomine sand flies in west africa", *am. j. trop. med. hyg.* 50(5), pp. 570-574.
192. Eva Zemanová et al. (2004), "Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin". 70(6), pp. 613-617.
193. M. J. Espy et al. (2006), "Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing", *Clin Microbiol Rev.* 19(1), pp. 165-256.
194. D. Musso and D. J. Gubler (2016), "Zika Virus", *Clin Microbiol Rev.* 29(3), pp. 487-524.
195. A. R. Plourde and E. M. Bloch (2016), "A Literature Review of Zika Virus", *Emerg Infect Dis.* 22(7), pp. 1185-92.
196. J. J. Waggoner and B. A. Pinsky (2016), "Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat", *Clin Microbiol.* 54(4), pp. 860-7.

PHỤ LỤC

Phụ lục 01: Phiếu thu thập thông tin sinh cảnh đặt bẫy muỗi cát

Quảng Ninh (30/5/2016-02/06/2016)

Mission number: 1
 Date: 30/05/2016
 Station n°/name: 1. Di Sô
 Weather: Sunny with clouds
 T°: 28°C
 H: 16°30

Head of mission: Tr NAM

Team: Anh, Ni, Phương, Yeu, P' Chau, Nam, Tu, Sơn, Hoàng, Nam 2

STATION INFO

Landlord's name: DAM QUANG HONG

Locality: (province/town/village) T0 17 KHU 2A Phường Hồ Phụng GPS lat: 07.24.8.25
 long: 2.32.04.09 - 117.11.8.9
 alt: 11m

General description: house with animals
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs / chicken
 Density: (high/mid/low) low (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity, ...) 4 (2 children)

Environmental description: rocks, forest, border of the village
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 17 Number of Sticky Traps collected: 15
 Give some details on SJ location: in the rocks Specific remarks on density of sand flies: nothing

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
<u>0</u>	<u>1</u>	<u>outside house</u>	<u>lab</u>
	<u>2</u>	<u>chicken place</u>	<u>SF=2</u>
	<u>3</u>	<u>dogs</u>	<u>SF=6</u>
	<u>4</u>	<u>1st cave</u>	<u>0</u>
	<u>5</u>	<u>2nd cave</u>	<u>1</u>

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Rem Lab

n° sand fly → ST = 3 → 11
CDC = 8 → 2 ST not sand fly
2 not sand fly

Lab → ST = 1
CDC = 1
SF = 2

Mission number: 1
 Date: 30/05/2016
 Station n°/name: 1/1.ou.isk
 Weather: 2 Sunny
 T°: 29°
H = 17h30

Head of mission: PHAM VAN QUAN

Team: Nan, Anlo, Nil, Yen, Phuong, Son, Tu, Huong, Nam 2, Di Chau

STATION INFO

Landlord's name: PHAM VAN QUAN

Locality: (province/town/village) Tô 3/Khu 1/P Hà Phong - TP Hà Long GPS lat: 0.704.966
 long: 103.0071
 alt: 26m

General description:
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken, pigeon, dog
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 1 the owner
 (n° of persons, activity...)
tourist place

Environmental description: rocks cave, animals
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 29... Number of Sticky Traps collected: 28
 Give some details on ST location: in the rocks Specific remarks on density of sand flies: ?

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	lab
OK open one	1	Top cave	SF=7	→ 2
	2	Top2 cave 2nd	SF=46	→ 45
	3	Chicken pka	SF=6	→ 5
	4	mid cave	SF=7	→ 5
	5	land house	SF=12	→ 9

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

SF → ST = 5 → lab 2
 CDC = 78 → 73 73

Mission number: 1
 Date: 30/05/2016
 Station n°/name: 3 patient 1
 Weather: Sunny
 T°: 29°C

Head of mission: P^a Nam

Team: Nam, Nil, Aulo, Yen, Phuong
Son, Tu, Di Chau
Huong, Nam 2

STATION INFO

Landlord's name: PHAM DUY YEN

Locality: (province/town/village) 42 A, Khu 5, P. Hai Phong, TP. HCM GPS lat: 07.3.55.32
 long: 107.19.177 48 UTM
 alt:

General description: House in village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: pigeon, chicken, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2, retired
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: House with garden and animals
 (Forest, type of vegetation, trees, banana trees, culture, bamboos)
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	n° SF/ Lab
OK	1	chicken place?	2 ok
	2	dog place		1
	3	inside garage		4
	4	inside House		2

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
family in law of the patient died
because of leishmania
CDC = 3

Mission number: 1

Date: 30/05/2016

Station n°/name: 4/pahat.1.2

Weather: Sunny

T°: 29°C

18h15

Head of mission: Pe Nam

Team: Nam Nil, Anb, phuong, Yen, Son, Tu, Di Chau, Huong, Namz

STATION INFO

Landlord's name: BUI THI NAN

Locality: (province/town/village) T. A, Khu 5, P. Hai Phong TP. Ho Long GPS lat: 072.55.62 long: 231.32.13 alt: 10

General description: (house, farm, rural area, village, cave...) House behind patient House border of village

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: 2 dogs
Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2
(n° of persons, activity...)

Environmental description: (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...) culture, water trees, village

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: 0
Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	n° SF	lab
	<u>1</u>	<u>garden</u>		<u>3</u>	<u>2</u>
	<u>2</u>	<u>dog place</u>		<u>0</u>	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) lab
SF → CDC = 3 → CDC = 2

Mission number: 1
 Date: 31.05.2016
 Station n°/name: 5 / Duck 1
 Weather: Sunny
 T°: 32°C

Head of mission: Pa Nam

Team: Nam, Nil, Anlo, Phuong, You, Son, Tu, Da, Chau, Hong, Nam 2

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) NGUYEN VAN HOA GPS lat: 20.977.83
To 22 Khu 2B Phung Hai Phong - Hong Gai Hanoi long: 107.168.69
 alt: 27m

General description: house on the border of the village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: Ducks / chickens / dogs
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status...)
Pigs

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rural area rocks behind the house
 (Forest, type of vegetation, trees, eucalyptus, fields)
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 30 Number of Sticky Traps collected: 30
 Give some details on ST location: Auto, you / wall Specific remarks on density of sand flies: Sf = 0

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	lab
	1	House Duck		
	2	behind house		
	3	pig house		
	4	on the mountain / bamboo	Sf = 1	ok
	5	inside house	Sf = 2	ok
	6	chicken		

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
after the village "cave"
Sf = 0 Sticky traps = 0 lab
CDC = 3 Sf = 3

Mission number: 1
 Date: 3/1/25
 Station n°/name: 6 / barbacane N1 station
 Weather: windy
 T°: 3.2

Head of mission: Pr Nam

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Mae van Tinh

Locality: (province/town/village) group 21 - 2 B - Hai Phong - Hai Lung GPS lat: 22.97849
 long: 107.16467
 alt: 25 m

General description: walls along the road
 (house, farm, rural area, village, cave...) rural area with houses

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken
 Density: (high/mid/low) low (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: road / rural area
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 36 Number of Sticky Traps collected: 36
 Give some details on ST location: wall along the road Specific remarks on density of sand flies: SF = 0

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>chicken</u>	
	<u>2</u>	<u>gardens</u>	<u>pb with battery</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
a lot of dust
four club de Nil
SF → ST = 0 CDC = 0

Mission number: 1
 Date: 01/06/2016
 Station n°/name: 2/camp pha 1
 Weather: dry sunny BATTAN
 T°: 34°C

Head of mission: Pa Nam

Team: _____

STATION INFO 15h30

Landlord's name: Vũ Thị Dũng

Locality: (province/town/village) Tổ 3 Khu 7 B Phung quang anh TP campha GPS lat: 20.993.97
 long: 107.204.04
 alt: 22m

General description: village in the border of rocks and forest outside camp pha
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs / pigs / chicken
 Density: (high/mid/low) low (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: village / family
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: village rural area, rocks
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	garden 1	SF = 0
	2	pigs 1 outside	SF = 0
	3	To case	SF = 0
	4	garden 2	SF = 0
	5	pigs 2 inside	SF = 0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) village - in the border of the forest
SF → CDC = 0

Mission number: 1
 Date: 01/06/2016
 Station n°/name: No/camp pho
 Weather: Sunny
 T°: 30°

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) To 5 Chu 76 phay quag Anh cam pha GPS lat: 20.94358
 long: 107.20187
 alt: 15m

General description: border of the toulu against the rocks
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: chicken / dogs/pigeon
 Density: (high/mid/low) f (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: families
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rocks, forest, building, cave
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 2
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	lab
	1	chicken/dogs		
	2	House garden		
	3	House garden 2		
	4	channel behind house/dog	SF = 14	4
	5	cave	SF = 63	58

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

total SF = CDC = 67 lab 62

Mission number: 1
Date: 01/06/2016
Station n°/name: 11/camp ha 3
Weather: sunny
T°: 30.6
17h15

Head of mission: Pi Jan
Team:

STATION INFO
Landlord's name:

Locality: (province/town/village) Same than station 10 GPS lat: 20.99273
long: 107.20847
alt: 43m

General description: border of the town against the rock farm
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: ducks, chicken, dogs
Density: (high/mid/low) mid (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: in front of the farm
(n° of persons, activity,...) many houses

Environmental description: rocks, forest, houses, ditches, mangrove
(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 0
Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>duck house 1</u>	
	<u>2</u>	<u>duck house 2</u>	
	<u>3</u>	<u>House n° 3 chicken</u>	
	<u>4</u>	<u>House n° 6 dogs</u>	<u>SF = 3 = 3</u>

GENERAL COMMENTS
(all important details, pictures...)
border town
total SF = 3

Mission number: 1
 Date: 01/06/2016
 Station n°/name: Nh. Campha 4
 Weather: Sunny
 T°: 30°C

Head of mission: Pa Nam

Team: Nam, Yen, Phuong, Tu, Son, Huong, Nil, Anso, D' Chau

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Tô 2 Khu 9 Bphãng Quang Khãnh, Cãm Phã GPS lat: 20.28753
 long: 107.19594
 alt: 12m

General description: border north of the town against rocks
 (house, farm, rural area, village, cave...) Small houses + caves in the rock

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs / pigs / chicken
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: families
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: inlapse in border of the town (cãm phã)
 (Forest, type of vegetation, caves, pigs house dogs, trees, bamboos)
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	lab
	<u>1</u>	<u>Pigs</u>		
	<u>2</u>	<u>Garden</u>		
	<u>3</u>	<u>Cave 1</u>	<u>SF = 63</u>	<u>1xide + 2xub 23SF = 64</u>
	<u>4</u>	<u>Cave 2</u>	<u>SF = 18</u>	<u>SF = 16</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total SF = 81 lab = 80

Mission number: A.....

Date: 02/06/2016.....

Station n°/name: B / Dream team.....

Weather: Sunny.....

T°: 34°C.....

Head of mission: Ph Nam

Team:

STATION INFO

Landlord's name:

Locality: (province/town/village)

Thôn Lương Kỳ, Xã Thống Nhất

GPS

lat: 21.064475.....

long: 107.070973.....

alt: 102m.....

General description:

(house, farm, rural area, village, cave...)

extended village in rural area
lowland

Animals: (yes/no) yes.....

Density: (high/mid/low) mid.....

if yes, detail:

(species, health status,...)

chickens, dogs, buffaloes
monkeys, pigs

Humans: (yes/no) yes.....

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

families

Environmental description:

(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

rural area mid forest area
hills - high trees - houses

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0.....

Number of Sticky Traps collected: 0.....

Give some details on ST location:

Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 6.....

343

N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	sf	lab
1	hill peak (partly) down			
2	mid hill	5cm		
3	pigs/monkeys			
4	chicken + pigs			
5	jack fruit chicken		1	1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)



Total SF = 1

Mission number: 1
 Date: 02/06/2016
 Station n°/name: 14 / chicken farm
 Weather: sunny
 T°: 26.5
 H: 1540
 Head of mission:
 Team:

STATION INFO
 Landlord's name: PHAN LUONG KHUYEN

Locality: (province/town/village) Thon hoi Ky, Xa Thoi Nhat, Huyen Hoanh Tai, Quang Ninh
 GPS lat: 21.063.107
 long: 107.066.995
 alt: 55m - 59m

General description: rural area, chicken farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: chicken / dogs / goats
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: family and worker
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rural area, forest, hill, other farms, around
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected: 0
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 5	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	lab
	1	House inside	SF=1	0
	2	park 1	SF=1	1
	3	park 2		
	4	park 3		
	5	goats	SF=1	1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
 thousand of chicken around ten dogs and goats
 defecant food - sud ovest
 total SF=3
 lab=2

Mission number: 1
 Date: 02/06/2016
 Station n°/name: 15/ buffalo
 Weather: sun
 T°: 34°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO
 Landlord's name: NGUYỄN VĂN BỐT (8 people, 5 children)

Locality: (province/town/village) Thị trấn Trà My, Xã Thông Nhài GPS lat: 21.25.284
 long: 107.25.5.25
 alt: 23 m

General description: house in rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens / dogs / buffalos
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...) many children

Environmental description: rural area border of the road
 (Forest, type of vegetation, rocks, trees, banana trees
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: 0
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	lab
	1	outside house	SF = 2	0
	2	buffalo house		
	3	rock 1 open	SF = 1	1
	4	rock 2 bamboo	Small ones	SF = 5
			lab →	SF = 3

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)
big works on the road
total SF = 4 lab

Mission number: 1
 Date: 02/06
 Station n°/name: 16 / Buffalo son
 Weather: sun
 T°:

Head of mission: P. Nam
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Wong van Ty

Locality: (province/town/village) Thôn đông vai, xã thôn nhất, huyện... GPS lat:
 lon:
 alt:

General description: farm or a village
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: Ducks, cows, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: so undergrowth
(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: 0
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>Duck</u>	
	<u>2</u>	<u>cows</u>	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
agressive cow - SF=0

Mission number: 1
 Date: 02/06/2015
 Station n°/name: 17/ buffalo chick
 Weather: Sunny
 T°: 30

Head of mission: Pu Nam
 Team: _____

STATION INFO 17³⁰
 Landlord's name: LUONG VAN DUNG

Locality: (province/town/village) Dông Xá - Xã Ninh - Huyện Bả
 GPS lat: 21.05813
 long: 107.11425
 alt: 22

General description: house
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: chicken/ buffaloes
 Density: (high/mid/low) Low (species, health status,...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: 5 people in family
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: allage - in front of rice field
 (Forest, type of vegetation, stone pit - culture
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 2
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>buffalo</u>	
	<u>2</u>	<u>chicken</u>	<u>SF=0</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Ninh Bình (27/6/2016-30/06/2016)

Mission number: 2 NINH BINH
 Date: 27/06/2016
 Station n°/name: 18/ goats
 Weather: ..caven.../windy
 T°:33°C.....

Head of mission: P^r JAN

Team: Yen, To, Son, Anho

STATION INFO

Landlord's name: Dinh van Hong

Locality: (province/town/village) Thôn Đa Hầm, xã Gia Hòa
 GPS lat: 20.25.18.1
 long: 105.51.59.7
 alt: 27m

General description: House with animals
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)yes..... if yes, detail : goats / dogs
 Density: (high/mid/low)mid... (species, health status...)
 chicken / pigs

Humans: (yes/no)yes..... if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: wet area forest and rocks
 (Forest, type of vegetation, ponds, palmier
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: ..0..... Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:3.....	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps \$
	1	haut d'arbre	2
	2	goat 1	1
	3	goat 2	
	1 bgt	terre pas de papie	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total SF = 3

Mission number: 2 / Ninh Binh
 Date: 27
 Station n°/name: 19 / Darius
 Weather: cloudy
 T°: 32°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Dinh van Quy

Locality: (province/town/village) Thon da hom, xa gia hoa GPS lat: 20°25'09.7
 long: 105°51'59.5
 alt: 29m

General description: House with cows, pigs, chicken farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: cows, pigs, chicken
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status...)
dogs

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: wet area forest rock
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	chicken		3
	2	pigs		0
	3	cows		0
	BF n°2	pigs 2		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total SF = 3

Mission number: 2... Ninh Binh
 Date: 27/06/2016
 Station n°/name: 20 / caves
 Weather: cloudy
 T°: 32°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Binh Van Quy

Locality: (province/town/village) Thon Binh, xã gia hien
 GPS lat: 20°25'24.3"
 long: 105°51'48"
 alt: 31m

General description: wet area, no houses
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: cows around
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) no
 if yes, detail:
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: forest and rocks
 (Forest, type of vegetation, wild animals → gros fossé)
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 21
 Give some details on ST location: Yes...
 Number of Sticky Traps collected: 20
 Specific remarks on density of sand flies: SF=3

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Micro
	1	open rocks	sun	5	1
	2	deep cave	tu	0	0
	3	door cave	top	15	13
	4	open rocks	left cave	16	14
	5	open rock	right cave	7	3
	6	fan cave	cigale	22	20

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
 Total SF (Micro) = 54

Mission number: 2 / Ninh Binh
 Date: 27/06/2016
 Station n°/name: 21
 Weather: Cloudy
 T°: 32°C

Head of mission: Ph Nam

Team: Tu, Yen, Jon, Aulo

STATION INFO

Landlord's name: Vũ Văn Tru

Locality: (province/town/village) Thôn Đa Hạp, Gia Hòa commune GPS lat: 20° 15' 36.3" long: 105° 51' 12.5" alt: 20m

General description: Farm rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: cows, dogs, chicken
 Density: (high/mid/low) high (species, health status...)
goats

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family + workers
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rural area forest + rocks
 (Forest, type of vegetation, culture de fruits)
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>4 + 1</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab
	1	goat house		3	1
	2	goat rock		6	4
	3	chicken house		5	3
	4	chicken rock		5	3
	B&B	chicken house		0	
	5	under water tank		0	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Insecticide 3 months ago
strong rain for 30 minutes
Total SF = 11

Mission number: 2
 Date: 27/06/2016
 Station n°/name: 22/ bees
 Weather: cloudy
 T°: 30.0

Head of mission: Pa Nam
 Team: Yeu, Tu, Son, Anho

STATION INFO

Landlord's name: Trần Văn Sang

Locality: (province/town/village) Trại Lũn hamlet, Dã Lãn commune GPS lat: 20° 23' 977 long: 105° 52' 416 alt: 21.m

General description: House in rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...) bees in breeding

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status, ...) cows

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: couple
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: rural area Forests
 (Forest, type of vegetation, rocks around
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>3 + 1 BG</u> N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
<u>1</u>	<u>chickens</u>		<u>0</u>
<u>2</u>	<u>dogs</u>		<u>0</u>
<u>2</u>	<u>cows</u>		<u>0</u>
	<u>bg n°4 front of the house</u>		<u>0</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) Bees breeding
rain between 4 and 5 am

Mission number:2.....
 Date: ...28/04/2016.....
 Station n°/name: ..23/.....
 Weather:sunny/sclouds.....
 T°:33.....

Head of mission: PR Nam

Team: Nam, Yen, Anne-Laure, Tu, So
Thao, Nguyen, Tu,

STATION INFO

Landlord's name: _____ Dinh Van Dinh (4 people; no children)

Locality: (province/town/village) _____ Thien Sam 3, Xa Cu Phuong

GPS lat: ...22.14.22.3..... 14.991
 long: ...105.41.11.0.....
 alt:20.5.....

General description: _____ House with animals
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)yes..... if yes, detail: _____ cows / dogs / goats / chickens
 Density: (high/mid/low)
 (species, health status...)

Humans: (yes/no)yes..... if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: _____ farm, animals, hills around,
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: ..0.... Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC:6.....	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Tab
	1	cows place		2	2
	2	house 1	dogs	0	0
	3	goats		1	1
	4	chickens place		1	1
	5	pig house		9	9
	6	cows 2	pig/hens/ducks	7	7

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

SF = 17

Stump taken in the night
 27 and 28 june - 4-5 am

Mission number:2.....
 Date:28/06/2016.....
 Station n°/name: ..2.A1.....
 Weather:sunny / clouds.....
 T°:23.....

Head of mission: P. Nam

Team: Nam, Van, Ann, Laure, Tin, Son
Trai, Nguyen, Tu

STATION INFO

Landlord's name: Dinh Van Han (6 people, 2 children)

Locality: (province/town/village) Thôn Sơn 3, Cúc Phương commune GPS lat:22.14...9.57.....
 long: ..105...9.1...32.1.....
 alt:191.....

General description: house, pigs farm, rocks and caves
children, goats, deer, bees, dog
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)yes..... if yes, detail: pigs (wild pig)
children, goats, deer, bees, dog
 Density: (high/mid/low) ...high...
 (species, health status...)

Humans: (yes/no)yes..... if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rock, caves and pig farm (wild pigs)
bees (no insecticide)
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: ...0... Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC:5.....	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	pig place		4
	2	cave 1		23
	3	cave 2		11
	4	wild pigs		9
	5	tree	forest	18

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) TSF=65

Mission number: 2
 Date: 26/06/2012
 Station n°/name: 45/1
 Weather: sunny and clouds
 T°: 30.6

Head of mission: P. Nam

Team: Nam, Yee, Dana, Cuong, Tu, Son
Thao, Nguyen, Tu

STATION INFO

Landlord's name: Phinh Van Nam (2 people)

Locality: (province/town/village) Bán Cỏ hamlet, Cúc Phụng Commune GPS lat: 22.13...963
 long: 105.42...204
 alt: 110

General description: goats farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: goat and human, goose
 Density: (high/mid/low) high (species, health status...) dogs, chicken, pigs, ducks

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2+
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: goat farm, wet area, forest
 (Forest, type of vegetation, culture, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 5 Number of Sticky Traps collected: 197
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	Cave left		98
	2	Cave right		15
	3	Cave center		80
	4	pig place		2
	5	chicken duck		2

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total SF = 197

Mission number: ...2.....
 Date:28/06/2016.....
 Station n°/name: 251.....
 Weather:sunny / cloudy.....
 T°:6 p.m. (-28°C).....

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Dinh Văn Bông

Locality: (province/town/village) Thôn Ngát, Lạc Phượng commune GPS lat: 20.14.972
 long: 105.43.179
 alt: 128

General description: rural house with animals
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)y/n..... if yes, detail: goats, chickens, dogs,
 Density: (high/mid/low) high (species, health status,...) buffaloes, cows, pig

Humans: (yes/no)y/n..... if yes, detail: people around village
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: hill, diversity of animals, rocks
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 10..... Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	Gate 1		0
	2	house 1	pig	0
	3	goat		0
	4	rock (cave)		2
	5	house 2 rock 2		2

total SF 4

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 2/3/2018
 Date: 29/05/2018
 Station n°/name: 221
 Weather: rain
 T°: 28

Head of mission: Anne

Team: Yen, Anne, Tu, Son
 Xuan, Thai, Tu, Xuyen

STATION INFO

Landlord's name: Ancestor cave

Locality: (province/town/village) Ancestor cave, Lạc Thủy, national park
 GPS lat: 20.12.602
 long: 105.42.44
 alt: 321

General description: cave, national park, forest
 (house, farm, rural area, village, cave,...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: wild animal
 (species, health status,...)

Humans: (yes/no) no
 if yes, detail:
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: cave, forest, rock
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps SF
	1	main cave	0
	2	cave 2	21
	3	cave 3	26
	4	cave 4	5
	5	cave 5	11

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
 Strong rain during the night 28 and 29 of June
 SF = 63

Mission number: *2.1. Nloh Binh*
 Date: *29/06/2016*
 Station n°/name: *28.f*
 Weather: *rain*
 T°: *28*

Head of mission: *Appa*

Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: *Cue Phuong national park street*

Locality: (province/town/village) *Cue Phuong NPark, street* GPS lat: *20.72.9.93*
 long: *105.22.11.0*
 alt: *229*

General description: *forest, rock, big tree*
 (house, farm, rural area, village, cave,...)

Animals: (yes/no) *no* if yes, detail : _____
 Density: (high/mid/low) (species, health status,...)

Humans: (yes/no) if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: *forest, big tree, rock*
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	sf
	<i>1</i>	<i>hold 1</i>		<i>8</i>
	<i>2</i>	<i>hold 2</i>		<i>0</i>
	<i>3</i>	<i>roche</i>		<i>8</i>
	<i>4</i>	<i>dead tree</i>		<i>1</i>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) *Total SF = 17*

Mission number: 2 of Ninh Binh
 Date:29/06/2016.....
 Station n°/name: 29.....
 Weather:rain & clouds.....
 T°:22.....

Head of mission: Anna

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Cac Phuong national park

Locality: (province/town/village) baoh h brighte GPS lat:20.....16.....9.3.....
 long:105.....42.....5.4.....
 alt:273.....

General description: brighte, forest, dry stream
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)no..... if yes, detail :
 Density: (high/mid/low) (species, health status...)

Humans: (yes/no)no..... if yes, detail:
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Forest, big tree, dry stream,
 (Forest, type of vegetation,
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF
	<u>1</u>	<u>brighte 1</u>		<u>1</u>
	<u>2</u>	<u>wood</u>		<u>0</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Total SF = 1

Mission number: ...*2/NBist.*
 Date:*29/06/2006*
 Station n°/name: ...*30/*
 Weather:*Rain...clouds*
 T°:*23*

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: *Coc plus, national park 3*

Locality: (province/town/village) *CP National park 3* GPS lat:*20...16...294*
 long:*105...40...700*
 alt:*233*

General description: *big tree with hole, forest*
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)*no* if yes, detail :
 Density: (high/mid/low) (species, health status...)

Humans: (yes/no)*no* if yes, detail:
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: *forest, big tree*
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	<i>1</i>	<i>tree hole 1</i>		<i>6</i>
	<i>2</i>	<i>tree 2</i>		<i>1</i>
	<i>3</i>	<i>tree 3</i>		<i>0</i>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Total SF = 7

Mission number: 2/M.B.M.
 Date: 29/04/2016
 Station n°/name: B-11
 Weather: Rain + clouds
 T°: 28.06

Head of mission: None

Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: forest protector house (CPNP)

Locality: (province/town/village) Cue phung national park GPS lat: 20.16.533
 long: 105.40.829
 alt: 228

General description: forest protector
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: dog, wild animal
 Density: (high/mid/low) low (species, health status,...)

Humans: (yes/no) Y/S if yes, detail: 1
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: house, forest, living room
 (Forest, type of vegetation, big tree
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: _____	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	house		0
	2	tree	(inside the tree)	14

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
total SF=14

Mission number: 2
 Date: 29/06/2016
 Station n°/name: 3.2.1
 Weather: rain, clouds
 T°: 26

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: wild life save house

Locality: (province/town/village) Cue Phuing National park, 4 commune GPS lat: 20.14, 2.28
 long: 105.82, 97.5
 alt: 113

General description: wild animal (Binturong)
 (house, farm, rural area, village, cave...) Small-toothed Palm civet

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: Binturong, Small-toothed
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status,...) Palm civet, leopard cat
Masked Palm civet

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: wild animal saving house
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: _____	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	tree 1	Binturong cat	0
	2	tree 2	Masked Palm civet & Pringus (or wild)	0
	3	tree 3	Leopard cat	1
	4	tree 4		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) _____ Total SF: 1

Mission number: 2
 Date: 29/06/2016
 Station n°/name: 35
 Weather: clouds
 T°:

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: deer, chicken house

Locality: (province/town/village) CP commune (CPNA) GPS lat: 20.14564
 long: 105.42.995
 alt: 142

General description: farm, forest, animal house
 (house, farm, rural area, village, cave...) deer, chicken

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: deer, chicken
 Density: (high/mid/low) (species, health status, ...) dog, birds

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: animal protection
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: forest, chickens deers
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	chicken house		0
	2	outside cage		0
	3	house		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) TSF=0

Mission number:².....
 Date:^{30/08/2016}.....
 Station n°/name:³⁴¹.....
 Weather:^{cloudy}.....
 T°:³⁰.....

Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: Pinapple farm

Locality: (province/town/village) Awang Son commune, Tam Dip district GPS lat:^{20.26.2.6}.....
Hang Nue hamlet long:^{105.50.23.9}.....
 alt:^{7.1}.....

General description: border of village, cave
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)^{yes}..... if yes, detail: cows, dogs, chicken
 Density: (high/mid/low)
 (species, health status...)
cat, goats

Humans: (yes/no)^{no}..... if yes, detail:
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rock, banana tree, pineapple
 (Forest, type of vegetation, cave
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: ⁶	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	tree 1 (rock)		0
	2	banana tree		11
	3	tree 3		15
	4	tree 4		10
	5	main cave		56
	6	tree 5		13

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)
2 house
8 goat's farm
9 cows farm

Total SF = 114

Mission number: 2
 Date: 20/06/2016
 Station n°/name: 251
 Weather: clouds
 T°: 30

Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: Pham Ngoc Oanh 520

Locality: (province/town/village) Thanh Son commune, Tam Diep district, Ninh Binh
Hang made bank
 GPS lat: 20.29.74.8
 long: 105.49.43.8
 alt: 7.9

General description: rural house, goats, cows, dogs, chickens, rock
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: cows and goats farm
 Density: (high/mid/low) high (species, health status,...) chickens, dogs

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 5
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: houses, cow and goat farm
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 12 Number of Sticky Traps collected: 25
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	cows		3
	2	goats		21
	3	rock		1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Total SF = 25

Mission number: 2
 Date: 30/04/2016
 Station n°/name: 3.6/
 Weather: cloudy
 T°: 32
 Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Mr Thi Thi

Locality: (province/town/village) Manjini hamlet, Thakson commune, TD district GPS lat: 20.29.64
 long: 105.49.98
 alt: 81m

General description: house next to the rock
 (house, farm, rural area, village, cave...) not far from the farm

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs, no
 Density: (high/mid/low) Density: (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3 (1 children)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: house, rock,
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 2	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	rock	18 SF
	2	house	3

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) TSF = 21

Mission number:2.....
 Date:30/08/2016.....
 Station n°/name:271.....
 Weather:cloudy.....
 T°:30.....

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Lê Quý Ngọc

Locality: (province/town/village) Flangnui Hamlet, Thanh Sơ commune GPS lat: 20.04.52.1
 long: 105.43.9.6
 alt: 78

General description: rock, corner of goats farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)y.l.s..... if yes, detail: cow, goats, dogs
 Density: (high/mid/low)

Humans: (yes/no)y.l.s..... if yes, detail: 4
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rock, house with farm
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:5.....	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	rock 1		1
	2	rock 2		6
	3	cow		1
	4	goats		3
	5	rock 3		17

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

T SF-28

Mission number: 3
 Date: 30/06/2015
 Station n°/name: 381
 Weather: clouds
 T°: 30


Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: Là Bá Tung

Locality: (province/town/village) 23rd km 41, Nam Sơn commune, TĐH district GPS lat: 20.08.48 long: 105.52.23.6 alt: 66

General description: house next to the mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) ✓ if yes, detail: chicken, 
 Density: (high/mid/low) (species, health status,...)

Humans: (yes/no) ✓ if yes, detail: 4 (2 children)
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: house, chicken, rock
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	<u>1</u>	<u>chicken</u>		<u>5</u>
	<u>2</u>	<u>rock</u>		<u>4</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Total SF = 9

Lạng Sơn (01/08/2016-04/08/2016)

Mission number: 3 / Lạng Sơn
 Date: 1/8/2016
 Station n°/name: 3 / House: 1
 Weather: sunny with clouds
 T°: 38°C

Head of mission: Prof. Vũ Sĩ Nam

Team: Yen, Sơn, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Vũ Xuân Tiến - SĐT 0163 2835280

Locality: (province/town/village) Khối 5 phường Tân Thành Thành
 GPS lat: 21.51.37
 long: 105.45.10
 alt: 267 m

General description: house with animals
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: pigs, chickens
 (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: family 5
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: house with chickens and pigs
 Cave behind the house
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 3
 Number of Sticky Traps collected: 10
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 3	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	CF
	1	bl. pig - chicken cage		0
	2	Cave		10
	3	chicken cage		0
Total				10

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Mission number: 3/ Lang Son
 Date: 1/8/2016
 Station n°/name: 10/ house - 2
 Weather: Sunny
 T°: 38°C

Head of mission: Prof. Van Sinh Nam

Team: Sam, Yee, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Vi Thi Lam - cell - 01574004748

Locality: (province/town/village) GPS lat: 21.51.378
 lon: 106.45.274
 alt: 272m

Plot: 8 - P. Tam Thanh

General description: House with chickens - ducks
 (house, farm, rural area, village, cave...) close to small road

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens - ducks
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2 ppl
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: House close to the hill - with chickens, ducks
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 1
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 2	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	close to the hill		0 CBC4
	2	chicken range		1 CDC5
				Total = 1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3/Long Son
 Date: 11/8/2016
 Station n°/name: P. J. hill (S13)
 Weather: Sunny
 T°: 28.9

Head of mission: Prof. Vu Sinh Nam

Team: Son, Yen, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name:

Locality: (province/town/village) Khôi Sơn - P. Tam Thôn
 GPS lat: 21.51.387
 long: 106.45.056
 alt: 282m

General description: hill top - cave
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: chickens, ducks
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) No
 if yes, detail:
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Hill with chicken around
 ppl live around.
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 6
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected: 0
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 2	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	
	1	Rock L	0	005
	2	up hill	0	007
			Total = 0	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3 / Lang Son
 Date: 11/8/2010
 Station n°/name: 42 house n°3 (V19)
 Weather: Sunny
 T°: 38°C

Head of mission: Prof. Vu Sinh Nam

Team: Yen, Thuong, Linh, Son, Thao (MC Lang Son)

STATION INFO

Landlord's name: Phan Thi Xuyen - SFH - 0253 710 387

Locality: (province/town/village) Khoi 6 - P. Tam Thanh GPS lat: 21.51.580
 long: 106.44.705
 alt: 159m

General description: House close to cave with dogs, pigs, chickens, ducks
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: pigs, chickens, ducks, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3 pp, 2 children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: House with rock cave behind
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 5 Number of Sticky Traps collected: 5
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF
	<u>1</u>	<u>chicken cage</u>		<u>0</u> <u>8</u>
	<u>2</u>	<u>cave - rock - bees nest</u>		<u>4</u> <u>9</u>
	<u>3</u>	<u>up hill - bamboo trees</u>		<u>1</u> <u>10</u>
	<u>4</u>	<u>pig cage</u>		<u>0</u> <u>11</u>
<u>Total = 5</u>				

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Mission number: 3/Long Son
 Date: 11.12.2016
 Station n°/name: 43/ house - 4 (ST5)
 Weather: Sunny
 T°: 32.6

Head of mission: Prof. U. Sime Nkomo

Team: Jan, Yen, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Ng^o Van Sy - Sdt. 0988 733 427

Locality: (province/town/village) FB^o 6 - P. Tam Thanh
 GPS lat: 21.51.260
 long: 106.44.708
 alt: 248m

General description: House - rock cave behind
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) Low
 if yes, detail: chickens, dogs, pigs
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes
 if yes, detail: 5 ppl. - family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: behind the house - rock hill
 close to the house under construction
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 4	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	CF
	1	chicken cage	dogs with small hole	0
	2	pig cage - 1		4
	3	Rock - rock	leave pig	1
	4	pig cage - 2		0
Total = 2				15

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3/Lang Son
 Date: 11/8/2016
 Station n°/name: 44/Tam Thanh cave
 Weather: Sunny
 T°: 38°C

Head of mission: Prof. Vu Minh Nam

Team: Yen - Son, Linh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: Tam Thanh Temple - Tourist check point

Locality: (province/town/village) Tam Thanh Temple - khóm 6 - P. Tam Thanh GPS lat: 21.51.39.0
 long: 106.49.81.0
 alt: 272m

General description: Tam Thanh Cave - Tourist place - Rock cave
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: wild animal - quail
 Density: (high/mid/low) (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: Tourist
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: Rock cave
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 3 Number of Sticky Traps collected: 20
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF Lab
	1	lower small hole		13	19
	2	inside the cave		1	1
	3	behind the shop		57	51
				Total = 71	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 2/8/2015
 Station n°/name: 95 / village
 Weather: Sunny... Cloud...
 T°: 35°C - 65.2 km/hid

Head of mission: SON

Team: Yen, Phuong, Linh, Son

STATION INFO

Landlord's name: Village

Locality: (province/town/village) GPS lat: 21.51.138
 Thôn Lương Cầu - Xã Tân Mỹ - H. Vĩnh Lương long: 106.45.325
 alt: 185m

General description: Rock mountain around the village
 (house, farm, rural area, village, cave...) rice field

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs, chickens
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: several families
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock mountain around the small village with
 (Forest, type of vegetation, few families, some chickens, dogs, rice field
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 9 Number of Sticky Traps collected: 9
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
	1	Small rock hole - 1	(left)	3	1
	2	Small rock hole - 2	(left)	12	9
	3	Small rock hole - 3 - along road	(right) - under the trees	0	
Total =				15	10

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 2/2/2016
 Station n°/name: 96/House
 Weather: Sunny
 T°: 35°C / 85% humidity

Head of mission:
 Team: Sen, Yen, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Hà Văn Thắng - sdt. 0967.599.094

Locality: (province/town/village) Thôn Lũng Cáo - Xã Tân Mỹ - H. Văn Lãng
 GPS lat: 21.59.19.7
 long: 106.40.09.5
 alt: 220m

General description: House in Lũng Cáo community - Nhung's locality
 (house, farm, rural area, village, cave...) In the end of the road, behind rock cave

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 4 ppl
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock behind the house
 (Forest, type of vegetation, stream near by - rice field around)
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 3 Number of Sticky Traps collected: 5
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
Behind the kitchen	1	Rock binding 1	behind the house	19	7
	2	Rock binding 2		0	0
	3	Rock binding 3		3	2
				Total = 9	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 21/8/2016
 Station n°/name: 47/house
 Weather: Summer, cloudy
 T°: 35°C / 85% humid

Head of mission: OGN
 Team: Son, Phuong, Yen, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Van Van Hinh - Sdt: 0169

Locality: (province/town/village) Thon Ta Lai - Xa Tai My
 GPS lat: 21.52.781
 long: 106.40.274
 alt: 229m

General description: House - behind - rock mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...) small rock hole

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: chickens, dogs
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: 6 ppl (2 children)
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Garden with longan trees, chickens + dogs
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...) High rock mountain behind / strong humidity

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 6
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected: 6
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
	1	Garden - close chicken		0	0
	2	small rock hole		0	0
	3	birding rack		4	6
	4	chicken cage		0	0
Total =				6	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 2/3/2016
 Station n°/name: 48/House-2
 Weather: Sunny w/ cloud
 T°: 36°C / 65°F - humid

Head of mission:

Team: Sam, Phay, Linh, Yen

STATION INFO

Landlord's name: Ng° Anh Thuy - sdt 01969.309.209

Locality: (province/town/village) Ta lai - Xá Tân Mỹ - H. Tân Mỹ
 GPS lat: 21° 57' 7.60"
 long: 106° 40' 3.80"
 alt: 235 m

General description: House with rock behind
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 5 ppl (1 child)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: Rock mountain behind
 Cave behind the house
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 6 Number of Sticky Traps collected: 23
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 1	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
	2	Cave 1		23	23
	1	Chicken cage		0	0
			Total		23

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Date: 2/8/2016 Head of mission: SON
 Station n°/name: 49/House - 3
 Weather: Sunny, wt. cloud.
 T°: 36°C / 65% humidity
 Team: Son, Yen, Phung, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Ma Van

Locality: (province/town/village) Ma Mao - X Tai My - Van Louy GPS lat: 21.58.56.8
 long: 105.40.34.6
 alt: 251m

General description: Garden close to rock mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: buffalo, chickens
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock mountain - buffalo cage close to the cave
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 8 Number of Sticky Traps collected: 8
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
	1	buffalo-chicken cage		6	4
	2	garden - 1		0	
	3	garden - 2		1	1
	4	garden - 3		1	3
	5	up hill		0	
	6	buffalo cage (in the way)		0	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total = 8

Mission number: 3/lang Son
 Date: 2/2/2016
 Station n°/name: 50/Tan Thanh cave
 Weather: Sunny - cloudy
 T°: 35°C / 65% humidity

Head of mission: SON

Team: SON, Jan, Phuong, Vinh

STATION INFO

Landlord's name: Re-trap at Tan Thanh cave

Locality: (province/town/village) Tan Thanh, Tp Lang Son
 GPS lat: 21.54.53
 long: 106.44.21.1
 alt: 259m

General description: Tam Thanh cave, tourist attraction
 (house, farm, rural area, village, cave...) Cave with small lake inside

Animals: (yes/no)
 Density: (high/mid/low)
 if yes, detail: (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: tourists
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: Cave - big - small lake inside
 (Forest, type of vegetation, large + large bats
 microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab SF
	1	Inside cave - 1	some prot*	40	40
	2	Inside cave - 2	deeper cave	22	22 (1 very small)
	3	behind the shop		3	3 (1 very small)
					65

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
 03/2/2016 → Collect traps weather: Rain - Heavy / high humidity
 25 traps in the cave have high density of sand flies

Mission number: 3
 Date: 3/8/2016
 Station n°/name: 51/village
 Weather: Rain/Cloudy
 T°: 26°C / 88°F Humid

Head of mission: SON
 Team: SON, Phray, Yen, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Village in the mountain

Locality: (province/town/village) Con Quyen - xa Hong Phay - H. Gio Lóc
 GPS lat: 21.55.37.7
 long: 106.40.7.6
 alt: 277m

General description: Village around the mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: chickens, ducks
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes
 if yes, detail: yes
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: several cave, rock hole, bamboo tree
 (Forest, type of vegetation, humidity, rice field, some small ponds)
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 5
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected: 2
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 5	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF lab
	1	on the way - rock hole 1		159	81
	2	on the way - rock hole 2		14	81
under tree -	3	on the way (right) - rock hole 3		0	0
	4	Rock hole (left)		73	74
	5	Behind the temple		25	23

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total = 359

Mission number: 3
 Date: 03/8/2016
 Station n°/name: 52/ House
 Weather: Cloudy
 T°: 26°C / 93.6 Humid

Head of mission: SON

Team: SON, Phuong, Yen, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Lang Van Gap

Locality: (province/town/village) Na Kien - Xa Hai Phong - Ao Lac
 GPS lat: 21.56.169
 long: 106.41.053
 alt: 274m

General description: House with ducks, chickens, dogs
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) mid
 if yes, detail: chickens, dogs, ducks
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes
 if yes, detail: 4 ppl (1 child with Down syndrome)
 (n° of persons, activity...)
 1 small child

Environmental description: House with the rock mountain behind
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 4
 Number of Sticky Traps collected: 4
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 4	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SEI lab
	1	Pig cage	- 5	4
	2	Rock behind - behind the house	- 0	
	3	Rock behind - 2 / cave	- 0	
	4	Cow cage - outside	- 0	
			Total =	4

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 2/8/2016
 Station n°/name: 53/Cave
 Weather: cloudy
 T°: 26°C / 88°F Humid

Head of mission: SON

Team: Yen, Son, Linh, Plucky

STATION INFO

Landlord's name: Cave

Locality: (province/town/village) Khon Khong - Hong Phiang - Cao Loc GPS lat: 21° 56' 00"
 long: 106° 01' 00"
 alt: 266 m

General description: cave
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: no
 Density: (high/mid/low) no (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: families live close
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: rocks - cave
(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 60
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	hab
	<u>1</u>	<u>Cave entrance</u>		<u>54</u>	<u>55</u>
	<u>2</u>	<u>under the tree</u>		<u>5</u>	<u>5</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total = 60

Mission number:
 Date: 03/08/2016
 Station n°/name: SF/behind the house
 Weather: Cloudy
 T°: 26°C f. 88°F Humid

Head of mission: SON

Team: Yan, Son, Phung, Linh

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Khôn Khương X. Hông Khay - H. Co Loc GPS lat: N. 21.56.040
 long: E. 106.41.031
 alt: 275m

General description: Rock hole - behind the house
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: ducks
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2 jamies
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock mountain
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 28
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF / Lab
<u>Hill - vegetable garden</u>	<u>1</u>	<u>rock holes behind the house</u>		<u>0</u>
	<u>2</u>	<u>Rock hole 2</u>		<u>27</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Tot = 28

Mission number: 3
 Date: 3/8/2016
 Station n°/name: 55/house
 Weather: cloudy/cool
 T°: 26°C / 85°F humid

Head of mission: SON

Team: SON, Yen, Linh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: Ông Việt Hùng + 01679.468.458

Locality: (province/town/village) Cần Thơ - Xã Hồng Phong - Cao Lỗ GPS lat: 21.55.998
 long: 106.41.384
 alt: 259m

General description: House with mountain behind.
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: 2 buffaloes, chickens, pigs.
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 4 ppl
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock mountain close to the house
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 23
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	ST	Lab
	<u>1</u>	<u>Rock hole</u>		<u>8</u>	<u>7</u>
	<u>2</u>	<u>behind the house</u>		<u>-16</u>	<u>16</u>
				<u>Total</u>	<u>23</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3
 Date: 3/8/2016
 Station n°/name: 56/Mountain/leuc
 Weather: Rain/c. cloudy
 T°: 26°C/85°F humid

Head of mission: SON
 Team: SON, Yen, Linh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: ~~Luân Văn Quang~~ Luân Văn Quang

Locality: (province/town/village) Ron Khương - Hông Phông - Cao Lộc
 GPS lat: 21.55.925
 long: 106.41.375
 alt: 263m

General description: Rock mountain close to the house
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: duck, chicken
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: 4 ppl (1 child)
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock mountain
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2
 Number of Sticky Traps collected: 2
 Give some details on ST location:
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	8F	9F Lab
	1	Inside the cave		40	62
	2	Cave entrance		37	38

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
 Total = 100

Mission number: 3
 Date: 3/8/2016
 Station n°/name: 57/cave
 Weather: Cloudy
 T°: 26°C / 88°F humid

Head of mission: SON

Team: SON, Yen, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Kon Kheang - Hong Phang - Cao Lac GPS lat: 21.55.85
 long: 106.41.27
 alt: 267

General description: house with cows "shit" - cave
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens, cows,
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Cave - Rock close the house
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 8 Number of Sticky Traps collected: 8
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	ST	SF lab
	1	Cave entrance - cow shit		0	
	2	Rock hole - chicken cage		2	2
	3	Cow cage		7	6
Total =				8	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) g: Big body (maybe blood or eggs)

Mission number: 3./Langson
 Date: 4/11/2016
 Station n°/name: 58/Nhi Thanh cave
 Weather: Cloudy
 T°: 28°C / 76°F

Head of mission: SON
 Team: SON, Yen, Linh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: Nhi Thanh Cave

Locality: (province/town/village) GPS lat: 21.51.09.1
 long: 106.45.12.3
 alt: 278m

General description: Nhi Thanh cave / tourist place
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) No if yes, detail :
 Density: (high/mid/low) (species, health status...)

Humans: (yes/no) No if yes, detail: security, monk
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: Rock cave with water fall (small)
 (Forest, type of vegetation, the combination of rocks)
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 22
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 7	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Lab
close [1	Rock hole - 25 (close to the entrance)	-4	4	1
	2	Right side of entrance cave 1 - 25	-5	5	5
	3	on the way to cave 2.	-4	4	5
	4	Rock Hole - top of cave entrance	-2	2	2
	5	lower cave entrance (small hole)	-3	3	3
	6	at the end of the cave 2	-4	4	4
	7	close to the pond in side the cave 2	-4	4	1

GENERAL COMMENTS (all important details, pictures...)

Saw CDC + 1 note
 Total = 22

Mission number: 3/ Langson
 Date: 7/8/2016
 Station n°/name: 89/ House
 Weather: Cloudy
 T°: 29°C / 86°F

Head of mission: _____
 Team: SON, Yui, Linh, Nhung

STATION INFO

Landlord's name: Ng^o Nham Su^u - SĐT 0167 345.3960

Locality: (province/town/village) GPS lat: 21.51.061
 long: 106.44.967
 alt: 734m
 Top the mountain - Ng^o Nham Su^u - To 1 -
 P Tam Thanh - Lang Son

General description: House close to the rock mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...) close to Nham Thanh cave

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: chickens
 Density: (high/mid/low) Low (species, health status,...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: 5 ppl
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: - Behind the house - Rock mountain
 (Forest, type of vegetation, chicken cage
 microhabitats, burrows, rocks, river...) - Nham Tam Thanh
 - Close to electric power company

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 6
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: 3	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	Behind the house		- 2
	2	Close to the rock mountain		- 3
	3	Inside the house		- 1
				Total = 6

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3. Langson
 Date: 4/2/2016
 Station n°/name: 60/ house
 Weather: cloudy
 T°: 28°C / 26°C

Head of mission: SOM

Team: Son, Gau, Vinh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: Province guest house

Locality: (province/town/village) Gua Nam, Chi lang, tp Lang Son GPS lat: 21.50.409
 long: 106.45.421
 alt: 265m

General description: a province guest house
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) No if yes, detail: _____
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: stuffs / guests
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: An office close to the rock mountain
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 2
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	low wall and rock mountain		- 1
	2	Rock Hole - 1		- 0
	3	Rock Hole - 2		- 0
Total =				1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 3/Lang Son
 Date: 4.15/2016
 Station n°/name: 61
 Weather: Cloudy
 T°: 30°C / 76°F humid

Head of mission: SON
 Team: SON, Yen, Linh, Phuong

STATION INFO

Landlord's name: Military Cave (not cave) - Svddchien

Locality: (province/town/village) Dg Van Vi - Chi lang - Tp Lang Son
 GPS lat: 21.50.124
 long: 106.45.9.36
 alt: 276m

General description: big Cave
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: bats
 Density: (high/mid/low) Density (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: close to the cave
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: - Cave with many bats
 (Forest, type of vegetation, - military stay during Chinese war
 microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 4 Number of Sticky Traps collected: 31
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 4	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SP	Lab
	1	Inside the cave		9	10
	2	Cave entrance		22	21
	3	Peepst inside - 1		0	
	4	Inside - 2		1	

Total = 31

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Lào Cai (22/08/2016-25/08/2016)

Mission number: 4
 Date: 23/08/2016
 Station n°/name: 62
 Weather: rainy
 T°: 26°C

Head of mission:

Team: Yao, Goz, Cuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Ming Van La

Locality: (province/town/village) Thôn Mường Vi, Lào Cai
(N°/P°/N) / Lào Cáo - Tả Sắt - Mường Vi - Nà Rìu

GPS lat: N. 22° 32' 47.7"
 long: E. 103° 47' 54.4"
 alt: 442 m

General description: small village
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: goats, horses, buffalo, chickens, pigs
 Density: (high/mid/low) low
(species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3 people
(n° of persons, activity...)

Environmental description: near paddy fields, trees and grasses and forest, rocks
Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: no Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps / Note
	1	buffalo and goat place	pt 1
	2	house place	pt 2
	3	tree	hang on tree near house
	4	house	under the roof, behind the house near trees, grasses and rocks
	5	pigsty	behind the house, under the roof, grasses, bamboo trees
	6	tree	with rocks, grasses & trees

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) No sand fly

Mission number: 4
 Date: 22/08/2016
 Station n°/name: 63
 Weather: rainy
 T°: 26°C

Head of mission:

Team: Yen, Son, Cuong, Hui

STATION INFO

Landlord's name: Hoàng Thị Thảo

Locality: (province/town/village) CSG
~~lao cai~~ lao cai - Batsat - Mung Vi
Nà Bìn

GPS lat: 22° 27' 8.75"
 long: 103° 47' 18.1"
 alt: 110 m

General description: village near mountains, rocks, stone, wild plants
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs, chickens, pigs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 2 people with 1 child
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: underground stream, rocks, grasses, mountains, near the field
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 2 Number of Sticky Traps collected: 0
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps / Note
0	1	cave (rocks)	be under ground, trees, rocks, grasses
0	2	house	behind the house, trees, vegetable and grasses
0	3	ten-roop	clay, stone, logs, grasses, & rocks

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
No sand fly

Mission number: A
 Date: 29/08/2016
 Station n°/name: 64
 Weather: cloudy
 T°: 26.6

Head of mission:

Team: Curry, Yoo, Hui, Sao

STATION INFO

Landlord's name: Son Van Vinh

Locality: (province/town/village) Lao Cai - Bat Sat - Muong Vi - Na Pin GPS lat: n. 22° 33' 16.2" (657)
 long: E. 103° 03' 40.4"
 alt: 167 m

General description: house near mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs, goat, pigs, buffalo
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3 people with 1 child
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house in village near mountain, trees, bamboo, wild plants, grasses
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 4 Number of Sticky Traps collected: 0
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps / Note
0	1	buffalo place	buffaloes, goats, bamboos
0	2	rocky hole	mountain, wild plants
0	3	rocky hole	mountain, wild plant
4	4	rocky hole	mountain, wild plant

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total = 4

CDC: 4
 CDC 1, 2, 3: 0

Mission number: 4
 Date: 22/08/2016
 Station n°/name: 65
 Weather: rainy
 T°: 26°C

Head of mission: _____
 Team: Yui, Son, Quynh, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Huong Van Hai Ly

Locality: (province/town/village) Lao Cai - Ban Sat - Muong Vi - Na Rin GPS lat: N 22° 33' 60"
 long: E 105° 42' 30"
 alt: 892 m

General description:
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: pigs, chickens, geese, ducks, dogs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 4 people with 2 children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description:
 Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...
House on the rocks with garden, trees, vegetable, pigs, chickens, longan trees, ducks, geese, banana trees, bamboo

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: NR Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>pine tree</u>	<u>near strip, rock, dirt</u>
	<u>2</u>	<u>plum tree</u>	<u>grasses, rocks (10'pm)</u>
	<u>3</u>	<u>rocky hill</u>	<u>banana trees, rocks, land</u>
	<u>4</u>	<u>gout place</u>	<u>goats, rocks, grass, trees</u>

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Total 4

CDC 1 : 0
 CDC 2 : 3
 CDC 3 : 1
 CDC 4 : 0

Mission number: 4
 Date: 23/8/2016
 Station n°/name: 66
 Weather: cloudy
 T°: 26°C

Head of mission: _____
 Team: Yen, Son, Cung, Linh

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) lao cai - Nahey stady - Nam chay - Sa Mui phin GPS
 lat: N 22° 43' 10.2"
 long: E 104° 09' 50.6"
 alt: 853 M

General description: mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) NO if yes, detail: _____
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) NO if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: mountain near the road, grasses, wildplant, taro trees, bananas trees, rocks, place that grow rock
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

FRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: NO Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	rocky hole	
	2	rocky hole	
	3	rocky hole	
	4	rocky hole	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total = 4

CDC 1 : 3 CDC 2 : 1
 CDC 3 : 0 CDC 4 : 0

032551204

Mission number: 86
 Date: 25/10/2016
 Station n°/name: 67
 Weather: Sunny and cloudy
 T°: 26°C

Head of mission: _____
 Team: Yen, Son, Linh, Luay

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) ao Cai - Muoi thuy - Nam Chay - Co' Ngu
 GPS lat: N. 22° 42' 66.2"
 long: E. 104° 08' 94.3"
 alt: 735 m

General description: _____
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) no if yes, detail: _____
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) no if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: wild birds, grasses, taro tree, cumin
 Forest, type of vegetation, rocks, near mountain, pumpkins, lemon trees
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: NO Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	rocky hole	
	2	rocky hole	
	3	rocky hole	
	4	rocky hole	
	5	rocky hole	

Total = 6

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC 3 : 2 samples
 CDC 2 : 1
 CDC 1 : 3
 CDC 4 : 0
 CDC 5 : 0

Mission number: 41
 Date: 23/08/2016
 Station n°/name: 68
 Weather: sunny
 T°: 26

Head of mission: _____
 Team: Yen, Sơn, Tuấn, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: Siêng Vàng Hòa

Locality: (province/town/village) lưu Cai - Mường Mũi - Nậm - Gia Khẩu A (số 2)
 GPS lat: N. 22° 01' 54.9"
 long: E. 104° 02' 00.0"
 alt: 686 m

General description: house in village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: chickens, pigs, ducks
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: 7 with children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house w/ near mountain, rocks, with chickens, grass, wild plants, papaya tree, mushrooms, rocks, banana trees, pigs, 90 ducks
 Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 1 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	1	rocky wall	no work
	2	rocky hole	
	3	papaya tree	
	4	grassy	90 ducks, pigs, near garden

Total = 1

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC 4 : 1
 CDC 1 : 0
 CDC 2 : 0
 CDC 3 : 0

Mission number: 4
 Date: 25.08.2016
 Station n°/name: 69
 Weather: sunny, s.b. cloudy
 T°: 26.5

Head of mission: _____
 Team: Yen, Son, Linh, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: Vàng Tô, Rừ

Locality: (province/town/village) Lào Cai - Mường Khương - Nậm Chông - Cầu Dừa
 GPS (563) lat: N 22°42' 8.73"
 long: E 104°09' 27.1"
 alt: 368 m

General description: village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken, buffaloes, dogs, ducks
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: chicken, buffalo 1
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house with garden + tree, grass, rocks, beyond mountain
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	1	under the tree	near big rock, grass, ground
	2	under tree	near rocky hole
	3	under tree	
	4	under the tree	under the tree, near tree, grass
	5	tree	near the house, tree

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) CDC 1, 2, 3, 4, 5: 0

Mission number: 4
 Date: 24/08/2016
 Station n°/name: 70
 Weather: Sunny, cloudy
 T°: 28°C

Head of mission: _____
 Team: Jun, Son, Luu, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: Ly A Chang

Locality: (province/town/village) Lào Cai - Sa-pa - Hân Thôn - Hạng Đa
 GPS lat: N. 22° 39' 54.2"
 long: E. 102° 53' 09.1"
 alt: 1629 m

General description: house in village border by mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) Low
 if yes, detail: chickens, birds, pigs, buffaloes
 (species, health status...) goats

Humans: (yes/no) Yes
 if yes, detail: 6 people 4 children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house border by mountains, rock, gardens, bamboos
 Forest, type of vegetation: corn tree, pumpkin, grasses, wild plants, flowers
 microhabitats, burrows, rocks, river... goats

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: NO Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps / Note
0	1	rocky hole	on mountain, near the house
	2	pigsty	in front of the house
	3	lyon bed	in front of the house
	4	pig sty	near the house, rocks
	5	Rocky hole	behind the house, covered by grasses
	6	rocky hole	covered by grasses on the mountain behind the house

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) CDC 1: 0

Mission number: A
 Date: 24.11.2016
 Station n°/name: 7A
 Weather: Sunny
 T°: 28.6

Head of mission: _____
 Team: Yeu, Sen, Linh, Quynh

STATION INFO

Landlord's name: ly A peo

Locality: (province/town/village) Lai Cai - Sapu - Hoi Thon - Hang Ai GPS lat: N. 22° 19.552'
 long: E 101° 52.999'
 alt: 1618 m

General description: house in village
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens, pigs, dog
 Density: (high/mid/low) low *(species, health status...)*

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3 with 1 children
(n° of persons, activity...)

Environmental description: house bordered by mountain, grasses, grow corn
Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 1 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>1</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	<u>1</u>	<u>pigsty</u>	<u>in front of house</u>

GENERAL COMMENTS

all important details, pictures... OK - 0

Mission number: 4
 Date: 24.10.2016
 Station n°/name: 72
 Weather: Sunny
 T°: 28.6

Head of mission:

Team: Yen, Son, Luu, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: ly A. Leng

Locality: (province/town/village) lao cai - Sapa - Hoi Thau - Hany dai GPS
 lat: N. 22° 19' 45"
 long: E. 103° 53' 02"
 alt: 1619 m

General description: house rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs, chickens
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house in village with garden, bordered by mountain, grasses, trees, chickens, ducks, pigs & buffaloes
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 4 Number of Sticky Traps collected: 0
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
pigs bit the net ←	1	behind house	under the net
	2	back of house	
	3	under rocky wall	under the tree on mountain
	4	bamboo	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC 1: 0
 CDC 2: 0
 CDC 3: 0
 CDC 4: 0

Mission number: 4
 Date: 29/10/2016
 Station n°/name: 73
 Weather: sunny
 T°: 28°C

Head of mission: _____
 Team: Yen, Son, Leub, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: Ly A De
 Locality: (province/town/village) Lao Cai - Sapa - Hieu Chui Ngai
 GPS lat: N 22° 13' 21"
 long: E 103° 59' 670"
 alt: 1562 m

General description: rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: goats, dogs, pigs, birds, buffalo, ducks, goats
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: 5
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: near in mountain, border by mountain, trees
 Forest, type of vegetation, log, prof, goats, birds, rocks, grasses, ducks
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: No... Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: 4	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps / Note
	1	house	outside, under the roof, buffalo, birds, log
	2	under the roof	
	3	tree	near pigsty and goat, rocks
	4	tree	near rocky hill; pig sty, trees, grasses

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC 1 : 0
 CDC 2 : 0
 CDC 3 : 0
 CDC 4 : 0

Mission number: 4
 Date: 24.03.2015
 Station n°/name: 71
 Weather: Sunny
 T°: 28°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Grang A DE

Locality: (province/town/village) Lao Cai - Sapa - Hanoi Thau - Hany Dai GPS lat: N 22° 14' 54"
 long: E 103° 53' 12"
 alt: 1585 m

General description: rural area
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: ducks, pigs, buffaloes
 Density: (high/mid/low) h.w. (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 6 with 4 children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house bordered by mountain, bamboo, rocks
 (Forest, type of vegetation, pigs, buffaloes, chickens)
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: N.D. Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps / Note
pigs bit the net. ←	1	house	under the net
	2	bamboo curve	behind the house, near by buffalo
	3	rock hole	next mountain, bamboo
	4	great place	
	5	great place	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC 5 : 0
 CDC 4 : 0
 CDC 1 : 0
 CDC 2 : 0

Mission number: 4
 Date: 25/08/2016
 Station n°/name: 75
 Weather: SUNNY
 T°: 27°C

Head of mission: _____
 Team: Yun, Son, Kent, Tuong

STATION INFO

Landlord's name: K10B

Locality: (province/town/village) Lào Cai - Lào Thàng - Xuân Dung - Thôn Vĩ
 GPS
 lat: N 22° 21.061'
 long: E 104° 17.918'
 alt: 190 m

General description: Cave under the mountain
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes
 Density: (high/mid/low) Low
 if yes, detail: horses, cows, goats
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes
 if yes, detail: army, goats
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: caves under the mountain, covered by trees, tara trees, grasses, bare soil
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 5 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	cave	
	2	cave	
	3	rocky hole	
	4	rocky hole	
	5	rocky hole	under bamboo

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

CDC2: 0 CDC4: 4
 CDC5: 0 CDC1: 77 + 1 (78)
 CDC3: 0

Total = 82

Mission number: 4
 Date: 25.10.2016
 Station n°/name: 76
 Weather: Sunny
 T°: 27°C

Head of mission: _____
 Team: Yen, Son, Linh, Cuong

STATION INFO

Landlord's name: Lô Văn Lưu

Locality: (province/town/village) Thôn Cai - Bao Thới - Xuân Thủy - Thôn Hàng Đa'

GPS lat: N. 20° 22' 55"
 long: E. 107° 29' 36"
 alt: 150

General description: house in village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: dogs, chickens, pigeons, pigs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: 3
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house in village, border of by mountain, trees, grasses, banana, vegetable, rocks, chickens
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 10 Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>10</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
	1	Rocky hole	cave behind the house, grasses, banana, trees
	2	Rocky hole	cave behind the house, long on trees
	3	ice big hole	, , ,
	4	cave	"
	5	cave	under the mountain, behind the house
	6	cave	
	7	cave	
	8	out side the cave	
	9	cave	aria hang
	10	under the tree	branches, on the mountain

CDC 2: 3 CDC 9: 11 CDC 5: 7-11=6 CDC 1: 12
 CDC 8: 15 CDC 10: 9 CDC 6: 3 CDC 4: 6
 CDC 7: 0

Total = 53

Mission number: 4
 Date: 25/08/2016
 Station n°/name: 77
 Weather: Sunny
 T°: 27°C

Head of mission:

Team: Yen, Son, Luis, Quory

STATION INFO

Landlord's name: Vũ Văn Thịnh

Locality: (province/town/village) lao Cai - Bao Thây - Xuyen Son - Thôn Trại V5 GPS lat: N. 22° 20' 55"
 long: E. 104° 17' 10"
 alt: 173 m

General description: house in village and chicken farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Yes if yes, detail: chickens, pigs, dogs
 Density: (high/mid/low) high (species, health status,...)

Humans: (yes/no) Yes if yes, detail: 6 with 1 child
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: house in village edge border by mountain, has garden, banana trees, chickens, pigs, longan trees, bamboo grove
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 6 Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>A</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps
	1	behind hen coop	
	2	bamboo	/ near pigsty → unwork.
	3	pigsty	
	4	hen coop	light was turned off by

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
CDC 4: 6
CDC 1, 2, 3: 0
Total = 6

Hà Giang (05/09/2016-09/09/2016)

Mission number: 5 / HÀ GIANG
 Date: 5/09/2016
 Station n°/name: 78
 Weather: Sunny, cloudy
 T°: 34

Head of mission: _____
 Team: Anne, Yee, Tin, Van, My
Thao

STATION INFO

Landlord's name: Phan Thi Chay

Locality: (province/town/village) Lũng Lát Lembang, Ngọc Linh county
 GPS lat: 22°40'00"
 long: 102°59'35"
 alt: 1000m

General description: house with poultry, rice field, coin nest tree, and area

Animals: (yes/no) yes
 Density: (high/mid/low) low
 if yes, detail: goat, duck, chickens, dogs

Humans: (yes/no) yes
 if yes, detail: (2 children) H mony

Environmental description: mountain, forest, rock, ricefield, coin rocks invaded by forest stilt house

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: 4
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF lab
<u>lab 0</u>	<u>1</u>	<u>stilt house (under)</u>		<u>0</u>
<u>(-2) (1+) 122</u>	<u>2</u>	<u>rock 1</u>	<u>tree</u>	<u>121</u>
<u>(-1) 29</u>	<u>3</u>	<u>rock 2</u>	<u>tree</u>	<u>28</u>
<u>(10+) 10</u>	<u>4</u>	<u>rock 3</u>	<u>tree</u>	<u>20</u>
				<u>Σ = 169</u>

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 5/20/16
 Station n°/name: 79
 Weather: cloudy
 T°: 3.9

Head of mission: 5

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Lý Văn Thành

Locality: (province/town/village)

GPS

lat: 22°40'47.2

Luang, Loat Ward, Nghe Binh Comm, Vinhjin Dist

long: 104°59'44

Ha Giang

alt: 122m

General description:

(house, farm, rural area, village, cave...)

wood house, feeding animal yard, ricefield garden, rural area

Animals: (yes/no) Y

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) high

(species, health status...)

goat, chicken, duck, buffalo, pig, dog

Humans: (yes/no) Y

if yes, detail:

(n° of persons, activity...)

3 children (H. non)

Environmental description:

(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

wood house, animal farm, village

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 6

Number of Sticky Traps collected: 9

Give some details on ST location:

Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab
<u>3</u>	<u>1</u>	<u>stilt house 1</u>			<u>3</u>
<u>under the house</u>	<u>3</u>	<u>stilt house 2</u>	<u>chickens chase, pig, dog</u>		<u>3</u>
	<u>2</u>	<u>stilt house 3</u>	<u>under the house</u>		<u>2</u>
	<u>3</u>				
	<u>4</u>	<u>stilt house 4</u>	<u>under the house</u>		<u>1</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Σ = 9

Mission number: 5
 Date: 5/09/2016
 Station n°/name: 80
 Weather: sunny/clouds
 T°: 31°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Trần Văn Lữ

Locality: (province/town/village) Khuất Khá Hòa, Hòa Bình
 GPS lat: 22.39.66.9
 long: 105.01.58.0
 alt: 105 M

General description: house beside the mountain, farm, rice field
 (house, farm, rural area, village, cave...) rural area, small road

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: pigeon, chicken, dog, goat, chicken
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status, ...) buffalo, pig

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 5 (2 kids)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: mountain, farm, house, rice cave, tree (bamboo)
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...) pond (urb/food)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 3	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SFls
no insect	2	house / pigeons		2
	20	farm	(pig, buffalo) dog chicken	0
	39	cave, 30m, behind the house		34
				(Σ = 36)

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) no insects for the CDC in animal houses? insecticide?

Mission number: 5
 Date: 5/09/2016
 Station n°/name: 81
 Weather: cloudy and humidity
 T°: 23

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Trần Văn Thanh (Phí Văn Chi)

Locality: (province/town/village) _____ GPS lat: 22.39.93.9
 long: 105.01.65.8
 alt: 101 M

General description: house + farm, high mountain with cave
 (house, farm, rural area, village, cave...) rice field, rural area, 3 houses

Animals: (yes/no) _____ if yes, detail: philly, dog, duck
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status, ...) buffaloes

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 4 (2 children)
 (n° of persons, activity, ...) 3 (1 child)

Environmental description: house + cave, mountain, farm, rocks
 (Forest, type of vegetation, rice field
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: ... <u>4</u>	N° (1.2...)	Localisation	Problems with traps	SFlat
0	1	farm	before the house/buffalook	0
(+1) 44	2	big rock 100m houses		45
0	3	farm 2	buffaloes	0
(+1) 57	4	rock no house	(big cave) high	58

$\Sigma = 103$

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 5/09/2016
 Station n°/name: 82
 Weather: cloudy
 T°: 33

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: phần Văn Miú

Locality: (province/town/village) Khóm Khe hamlet, Nl commune
Vi Xuyin dist, Va Giaz province

GPS lat: 32.40.09.6
 long: 105.01.34.8
 alt: 122.00

General description: house behind mountain, farm
wral area, forest

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: buffallo, chicken
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status,...)

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 2
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: wood house, nice field, buffallo farm
forest behind

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
<u>0</u>	<u>1</u>	<u>buffallo farm</u>	
<u>0</u>	<u>2</u>	<u>forest</u>	

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 6/09/2016
 Station n°/name: 8.3
 Weather: Sunny
 T°: 34

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Vi Văn Văn

Locality: (province/town/village) Lưu Thủy Hamlet, Bình Tiến Commune, Quãng Ba District, MG GPS lat: 23° 01' 40" long: 104° 57' 31" alt: 258 m

General description: House yard, ricefield, high mountain
 (house, farm, rural area, village, cave,...)

Animals: (yes/no) if yes, detail: dog, pigeon, pig, buffalo, chicken
 Density: (high/mid/low) (species, health status,...)

Humans: (yes/no) 6 if yes, detail: 3 children (bà Hân)
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: high mountain, rock, ricefield, coin, bamboo
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	rock		0
	2	pig place		0
	3	ply and buffalo's place		0
	4	rock		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Strong rain during the night
many ants

Mission number: 5
 Date: 06/09/2016
 Station n°/name: 34
 Weather: SUNNY
 T°: 34

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Phạm Văn Anh

Locality: (province/town/village) Vinh Tân huyện, 2 km GPS lat: 23.92126
ở dưới Hố lầy long: 104.52357
 alt: 35.5

General description: house, pig farm,
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) if yes, detail: pig, dog, chicken
 Density: (high/mid/low) (species, health status, ...) pigeon, buffalo

Humans: (yes/no) 3 if yes, detail: 1 child
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: rural house, banana tree, rock, bamboo
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	pig place		0
	2	pig place		0
	3	buffalo		0
	4	rock	corn, ponds, vegetable, bit	0
		hole	tomato	0
	5	rock		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) rain - strong rain - may flying out

Mission number: 5
 Date: 6/09/2016
 Station n°/name: 05
 Weather: Sunny
 T°: 34°C

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Vương Trung Phấn, Mã ~~At~~ Minh Kiên

Locality: (province/town/village) Bố Lát hamlet, DT commune, 09, 1/6 GPS lat: 2.3° 04' 36.2"
 long: 104° 57' 42.0"
 alt: 85.9

General description: rural house, buffalo, chicken, ducks
 (house, farm, rural area, village, cave...) rock farm

Animals: (yes/no) ✓ if yes, detail: buffalo, chicken, duck
 Density: (high/mid/low) ✓ (species, health status,...) pig, pigeon

Humans: (yes/no) 7 if yes, detail: (Wildfire)
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: banana, fresh food, rice field
 (Forest, type of vegetation, bamboo
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	buffalo place		0
	2	buffalo place		0
	3	rock hole		0
	4	rock hole	river, forest, stream	0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) stay here, many flying out

Mission number: 5
 Date: 6/09/2016
 Station n°/name: 86
 Weather: sun
 T°: 34.0

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name: Vàng Thi Thuong CDC3

Locality: (province/town/village) Khuê Thượng hamlet, B.T commune GPS lat: 23°00'26.2"/76.2
Quảng Bình, V/L province long: 109°52'09.6"/106
 alt: 819

General description: forest, rock, cave
 (house, farm, rural area, village, cave...) village, culture

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: buffalo, pig, dog
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status,...) chicken

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: small village
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: forest, buffalo farm, lotus pond
 (Forest, type of vegetation, small area, small village, garden, plantation
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	rock cave		0
	2	buffalo place	pig	0
	3	pp place		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Strong rain during night, many flying
ants in the traps!

Mission number: 5
 Date: 06/09/2016
 Station n°/name: 87
 Weather: sunny
 T°: 34°C

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name:

Locality: (province/town/village) Luang Prabang hamlet, Ban Thon commune, Ban Bo dist, LA GPS lat: 23°0'47.8"
 long: 102°59'42.6"
 alt: 826

General description: 1 - small pagoda, forest, rock in the village
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) no if yes, detail: _____
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status...)

Humans: (yes/no) no if yes, detail: activity day time
 (n° of persons, activity...) visit place

Environmental description: forest, rocky, pagoda
 (Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: _____	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	1	rock under the temple		0
	2	in the forest, small rock park of the temple		0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
strong rain - a lot of ants

Mission number: 5
 Date: 08/09/2016
 Station n°/name: ST88
 Weather: SUNNY
 T°: 29°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Tran Van Hai

Locality: (province/town/village) HA GIANG/Minh Khai
commune
 GPS lat: 22.69.206'
 long: 104.59.442'
 alt: 116m

General description: in the town, houses against rock
 (house, farm, rural area, village, cave...) urban area border of the
mountain

Animals: (yes/no) YES
 Density: (high/mid/low) 1
 if yes, detail: chicken, dogs, duck
 (species, health status,...)

Humans: (yes/no) YES
 if yes, detail: 2 persons
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: urban areas, light garden with
 (Forest, type of vegetation, banana trees, wood/stock just in front
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...) of mountain bamboo thicket and
forest, poultry in forest

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF Lab
	CDC1	rock behind house 1 (com)		0	
	CDC2	rock behind house 1 (com)		14	14
	CDC3	House 2 rock		0	
	CDC4	forest rock		95-21	93

Total = 107 SF Lab

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) trash in the garden and
behind the house 1

00

Mission number: 5
 Date: 08/09/2016
 Station n°/name: 89
 Weather: cloudy
 T°: 30°C

Head of mission:

Team:

STATION INFO

Landlord's name:

Locality: (province/town/village)

GPS

lat: 22.43.986

long: 104.59.437

alt: 112

Ha GIANG/Tinh Khai
commune

General description:

(house, farm, rural area, village, cave...)

urban area, on the border of

Animals: (yes/no) yes

if yes, detail:

chickens, dog;

Density: (high/mid/low)

(species, health status...)

ducks.

Humans: (yes/no) yes

if yes, detail:

town

(n° of persons, activity...)

Environmental description:

(Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

Houses on the border of the mountain
forest chicken house with dogs
outside, urban areas

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed:

Number of Sticky Traps collected:

Give some details on ST location:

Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:

N° (1,2...)

Localisation

Problems with traps

SF SFLs

CDC1 chicken house forest border
behind house 1

6 6

CDC2 bamboo tree behind house

0

CDC3 rock a small cave house 3
mountain

0

Total = 6

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 5
Date: 08/09/2016
Station n°/name: ST90
Weather: sunny
Time: 3:20

Head of mission:
Team:

STATION INFO

Landlord's name: Chi Thuy

Locality: (province/town/village) HA GIANG / NINH KHAI
GPS lat: 22.48784
long: 104.59453
alt: 111

General description: town houses with garden border of the road, school

Animals: (yes/no) 1
Density: (high/mid/low) low
if yes, detail: dog, cat
(species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes
if yes, detail: family
(n° of persons, activity,...)

Environmental description: urban area big house with garden border of the road against road - pomelo tree

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed:
Give some details on ST location:
Number of Sticky Traps collected:
Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
	CDC 1	behind the house	rock in the hole	0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)
Insecticide, coffee shop

Mission number: 5
 Date: 03/09/2016
 Station n°/name: 91
 Weather: Sunny
 Humidity: 30

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: _____
 Locality: (province/town/village) Ha GIANG Trấn Phú Tả 2

GPS
 lat: 22 49 790
 long: 104 59 502
 alt: 115

General description: Urban area, commune Ha Giang
 (house, farm, rural area, village, cave, ...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chickens, dogs
 (species, health status, ...)

Density: (high/mid/low) high

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: quarrel / many houses
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: border of the town, mountain
 (forest, type of vegetation, rock, many hills, forest)
 (microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	\$flab
	CDC1	road house		0	
	CDC2	rock on the mountain		0	
	CDC3	forest 2 under chicken farm		3	3
		forest			

Total = 3 sf lab

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

mission number: 5
 date: 03/09/2016
 station n°/name: 92
 weather: Sunny
 temp: 38C

Head of mission: _____

Team: _____

LOCATION INFO

landlord's name: _____

locality: (province/town/village)

HA GIANG / TRAN PHU

GPS

lat: 22° 50' 212"

long: 104° 58' 265"

alt: 157m

general description:

(house, farm, rural area, villoge, cave...)

border of the town house with garden against mountain!

animals: (yes/no) yes

density: (high/mid/low) mid

if yes, detail:

(species, health status...)

chickens + dogs
↑
farm

humans: (yes/no) yes

if yes, detail:

(n° of persons, activity...)

quarter many houses

environmental description:

(forest, type of vegetation,

microhabitats, burrows, rocks, river...)

urban area against rock with forest, garden with many plants

RAP INFO

number of Sticky Traps installed: _____

give some details on ST location: _____

Number of Sticky Traps collected: _____

Specific remarks on density of sand flies: _____

number of CDC: 3

N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF	OK
CDC1	empty house rock		1	
CDC2	House / chicken farm		3	
CDC3	rock behind house		4	

Total = 8 OK

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Stop for a drink

Weather: sunny
 Temp: 30°C

Team: _____

LOCATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) HA GIANG / Ngungin Thien

GPS lat: 22.49589
 long: 104.58873
 alt: 125

General description: border of the town against rock mountain, garden and forest

Use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: dogs / chickens
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: many hours
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: urban area, houses against rock mountain, forest

Forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: 3

N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
CDC ₁	rock 1 behind house 1		0
CDC ₂	rock 2 behind house 2		13
CDC ₃	house 2		0

Total = 13 ok

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 08/29/2016
 Station n°/name: 94/170
 Weather: SUNNY
 Humidity: 70%

Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: _____
 Locality: (province/town/village) AA GIANG / Nguyen Trãn GPS lat: 22.49.628
 long: 104.58.783
 alt: 132

General description: border of the town, behind hug's home
 (house, farm, rural area, village, cave,...) house against rock/mountain

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken and duck
 Density: (high/mid/low) mid (species, health status,...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: many houses
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: urban area, houses against rock
 (forest, type of vegetation, mountain, chicken, house behind
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...) hills

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>1</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF lab
	<u>1</u>	<u>near behind hug's house</u>		<u>8</u>	<u>1</u>
		<u>near chicken farm</u>			<u>7</u>

Total = 7 SF lab

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) _____

Son La (10/10/2016 – 14/10/2016)

Mission number: 6 **SON LA**
 Date: 10/10/2016 Head of mission: Prof Nam
 Station n°/name: 9
 Weather: cloudy
 Time: 2.9
 Team:

LOCATION INFO

Landlord's name: Ng Van Thang
 Locality: (province/town/village) Santa / Mai Son / G. No commune GPS lat: 21.28.27
19/1 hamlet long: 104.01.61
 alt: 653

General description: small house, mountain, rock, cave
 (house, farm, rural area, village, cave...) rural area, cave, pig farm

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: pig, dog
 Density: (high/mid/low) Y (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 3 / 1 farmer (kind)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: xigacane, bamboo, teagan
 (forest, type of vegetation, rock, soil, bean, pig farm)
 (microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 0 Number of Sticky Traps collected: 6
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF Lab
<u>ti 202</u>	<u>1</u>	<u>cave 1</u>	<u>not full</u>	<u>203</u>
<u>07</u>	<u>2</u>	<u>cave 2</u>	<u>not full</u>	<u>08</u>
<u>50</u>	<u>3</u>	<u>cave 3</u>	<u>not full</u>	<u>50</u>
<u>Σ 200</u>				<u>Σ = 261</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 12/11/13
 Station n°/name: 9.6
 Weather: cloudy
 : 29

Head of mission: prof Nass
 Team: Phan, Tin, Yen, Son

STATION INFO
 Landlord's name: Hg Ba Quyen / Ng Huu Quyen

Locality: (province/town/village) Nat Cat Commune / Maison dist / So La province

GPS lat: 21° 13'
 long: 104° 25'
 alt: 513

General description: rural house, orch, garden, ...
 (house, farm, rural area, village, cave, ...)

Animals: (yes/no)
 Density: (high/med/low) high

if yes, detail: chicken, pig, dog, cow
 (species, health status, ...) all

Humans: (yes/no)
 if yes, detail: 4 (1 child)
 (n° of persons, activity, ...) (Kil)

Environmental description: garden next military camp, pig farm, cow, chicken, banana, mango, ...
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 5
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected: 3
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF labo
0 CDC1	1	orch		1
1 CDC2	2	orch		1
1 CDC3	3	orch		1
1 CDC4	4	chicken farm		1

Σ labo = 3

GENERAL COMMENTS
 (fill important details, pictures...)

Mission number: 2
 Date: 10/10/10
 Station n°/name: 27
 Weather: 27°
 Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Ng Ba Leing

Locality: (province/town/village) Wat Lat Commune / Pailon Ait / Souta provincial
 GPS lat: 21.10.9.02
 long: 104.03.3.05
 alt: 568

General description: rural house, pig farm, rocky
 (ruse, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: dog, piggy, chicken
 Density: (high/mid/low) high (species, health status...)

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 5 / 3 children
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: wind house, mango, dragon fruit, jack fruit
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>3</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	SF lab
<u>0 CDC1</u>				
<u>6 CDC2</u>		<u>inside house</u>		<u>6</u>
<u>0 CDC3</u>		<u>rock hole</u>		<u>1</u>

5-13

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number:
 Date: 10/12/06
 Station n°/name: 95
 Gatherer: J. B. ...
 : 27/6
 Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Nô Bân I Bôn

Locality: (province/town/village) Hat Lot Commune, Haison dist, Sonla pr
 GPS
 lat: 21° 11' 03"
 long: 104° 03' 22"
 alt: 500m
 Nô Caug hamlet

General description: rural house, dog, chicken, pig, farm
 (use, farm, rural area, village, cave...) rocky garden, turkey

Animals: (yes/no)
 Density: (high/mid/low)
 if yes, detail: dry chicken, turkey, pig
 (species, health status, ...)

Humans: (yes/no)
 if yes, detail: 1p (farmer, kirkh)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: rural house + garden, rocky, chicken + pig
 (forest, type of vegetation, food fruit, mango, lemongrass tree)
 (crot habitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed:
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected:
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 4	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	8 flab
0 CDC 1		chicken + pig farm		12
13 CDC 2		rocky garden		05
05 CDC 3		rocky hold		01
01 CDC 4				
Σ 19				(Σ = 30)

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 10/12/15
 Station n°/name: 3
 Gatherer: Chandy
 : 29.6

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Hg Khai Uay

Locality: (province/town/village) Nà Cay hamlet, Hat Lát commune, Mardun district, Saka
 GPS lat: 21° 11' 13.7"
 long: 104° 25' 33.5"
 alt: 56m

General description: rural house, garden, rock
 (rural house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: dog, chicken, cat
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 4 (2 children)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: rural house, garden, rock, jack fruit, longan, mango
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF lab
3 CDC1	<u>1, 2, 3</u>	<u>rock & hole</u>		<u>3</u>
2 CDC2	<u>4, 5</u>	<u>rock & hole</u>		<u>2</u>
0 CDC3				
1 CDC4	<u>6</u>	<u>rock - back chicken lawn</u>		<u>1</u>
<u>Σ 6</u>				<u>(Σ = 6)</u>

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

Mission number:
 Date: 11/10/2016
 Station n°/name: 105
 Gatherer: Andy
 : 29

Head of mission: Prof Nam

Team: Tu, Yen, Son

STATION INFO

Landlord's name: Levy Van Quan

Locality: (province/town/village) Hoa Nam hamlet, Nam Pôn commu
MLA, Sola

GPS lat: 21.33.02N
 long: 104.07.09E
 alt: 226

General description:
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)
 Density: (high/mid/low)
 if yes, detail: dog, cow, chicken, duck
 (species, health status...)

Humans: (yes/no)
 if yes, detail: 5 (Thai)
 (n° of persons, activity...)

Environmental description:
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)
wood house, animal farm, jack fruit orch,

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed:
 Give some details on ST location:

Number of Sticky Traps collected:
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF lab
CDC 1		Animal pen		5	5
CDC 2		balony off		0	3
CDC 3		Animal place		2	
				7	8

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

299,

Mission number:
 Date: 11/10/2016
 Station n°/name: 101
 Weather:
 Head of mission:
 Team:

LOCATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Hue Banlei, Nam Phin commune, Muong La dist
 GPS lat: 16.34.13.8
 long: 106.04.24.5
 alt: 443 m

General description: wood house, pond, mountain, sh. duck, chicken farm
 (house, farm, rural area, village, cave...) Luuffala

Animals: (yes/no) ✓ if yes, detail: chicken, duck, buffalo
 Density: (high/mid/low) M (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) ✓ if yes, detail: 2 (1 child)
 (n° of persons, activity, ...) Thai minority

Environmental description: wood rural house next stream, rice field
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC:	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF lab
CDC1		wood house		8	8
CDC2		rock hole		11	10
				19	

$\Sigma = 18$

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 11/10/2016
 Station n°/name: 102
 Weather: cloudy
 Humidity: 39%

Head of mission: _____
 Team: 9

STATION INFO

Landlord's name: Lô Văn Quý

Locality: (province/town/village) Hà Nam, Nam Phương commune, Ml. 107, St. 100 GPS lat: 21.33.43.2
 long: 104.2.55.4
 alt: 436

General description: rural house + animal farm + rock
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) if yes, detail: pigs, cows, buffaloes
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status, ...) chickens

Humans: (yes/no) if yes, detail: 4 (1 child)
 (n° of persons, activity, ...) 1 low mortality

Environmental description: rural house, animal farm, next to mountain
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	SF lab
<u>CDC 1</u>		<u>cow farm</u>	<u>net, trap, pig</u>	<u>5</u>	<u>5</u>
<u>CDC 2</u>		<u>rock</u>		<u>5</u>	<u>5</u>
				<u>10</u>	

$\Sigma = 10$

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

mission number: 6
 date: 14/10/2016
 station n°/name: 703
 weather: cloudy
 time: 29:6

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

landlord's name: Lô Văn Hoàn

locality: (province/town/village) the market, Nam Lâm commune, M La, Siha
 GPS lat: 21.35216
 long: 104.03218
 alt: 702

general description: wood house, chicken farm, rural area, next mountain
logan, jack fruit

animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken, buffallos
 density: (high/mid/low) _____ (species, health status, ...)

humans: (yes/no) yes if yes, detail: 9 (3 children)
 (n° of persons, activity, ...) 7 Bai

environmental description: wood house, animal farm, next mountain, small garden
 forest, type of vegetation, under the house
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

RAP INFO

number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Lab
CDC1		animal		0	
CDC2		pig farm		0	
CDC3		under the house		4 -1	3
CDC4		animal place		2	2
				6	

$\Sigma = 5$

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

Mission number:
Date: 11/10/2016
Station n°/name:
Weather:
:

Head of mission: _____

Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) _____
GPS lat: ... 21.33.42.7
long: ... 104.05.52.8
alt: ... 222
Ho Rau Cal, Nam Tan Commune, Viet Nam

General description: _____
cave, rice field, stream
(house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) No if yes, detail : _____
(species, health status, ...)

Humans: (yes/no) No if yes, detail: _____
(n° of persons, activity, ...)

Environmental description: _____
caves next stream and rice field
(forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 2	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Lab
CDC 1		<i>cave 1</i>		1	4
CDC 2		<i>cave 2</i>		0	

4
Σ = 4

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

Mission number:
 Date: 11/10/2016
 Station n°/name: 165
 Weather:
 Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Nay Hing, haat, Nam Pim, Louang GPS lat: 21°33'34.4
 long: 104°03'33.2
 alt: 325

General description: wood house, animal farm, humans,
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: cow, chicken, dog
 (species, health status...)
 Density: (high/mid/low) _____

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 2 (1 children)
 (n° of persons, activity...)
La Ha vicinity

Environmental description: wood house, animal farm, next street,
 (forest, type of vegetation, crohabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: LDC1 LDC2	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
		<u>under house</u>		<u>3</u>
		<u>tree hole</u>		<u>0</u>
				<u>(Σ = 3)</u>

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 11/01/2016
 Station n°/name: 166
 Weather: cloudy
 Time: 2400

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) Nhị Liên, huyện, Nam Định, tỉnh, Hà Nam, Việt Nam
 GPS lat: 21.32.17.2
 long: 104.02.9.29
 alt: 32.5

General description: cave + kahana, rice field
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) no if yes, detail: _____
 Density: (high/mid/low) _____ (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) no if yes, detail: _____
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: cave, street, bamboo trees
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>1</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF
<u>CDC 1</u>		<u>cave</u>	<u>light trap</u>	<u>0</u>
				<u>0</u>

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number: 5
 Date: 14.10.2016
 Station n°/name: 107
 Weather: cloudy
 Humidity: 79%

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Wang Van Chien

Locality: (province/town/village) Huô Nôn hamlet, Nâm Pôn comm, M'la, S'la
 GPS lat: 21.32.42.5
 long: 104.01.40.7
 alt: 262m

General description: wood house, animal farm, pond, rice field
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: buffalo, goat, cow, chicken, pig, dog, duck
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 4 (2 children) Thai
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: wood house, rice field, animal farm, pond
 (forest, type of vegetation, crohabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>7</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	ST
<u>off to road</u> <u>COU</u> <u>7</u>		<u>animal place</u>		<u>0</u>
		<u>animal place</u>		<u>0</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Station number: 6
 Date: 12.12
 Station n°/name: 1.08
 Weather: cloudy
 Time: 3:10

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Lô Văn Ichai

Locality: (province/town/village) Phước Bình, huyện Thuận Thành dist / xã Lê Minh Xuân commune
 GPS lat: 21.17.66.9
 long: 103.44.2.92
 alt: 2.63

General description: wood house, with pig house, jungle,
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: chicken, dogs, pig's
 Density: (high/mid/low) high (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 3
 (n° of persons, activity, ...) (Thai minority)

Environmental description: wood house next forest & chicken place
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
<u>under house CDC</u>			<u>SF</u>
<u>pig place CDC</u>			
			<u>2</u>

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...) _____

Mission number: 6
 Site: 12/10
 Station n°/name: 10.9
 Weather: sunny
 Date: 31°E

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Quản Văn Diệt

Locality: (province/town/village) Bố Hải, Mũi Né, Phan Thiết, Bình Thuận
 GPS lat: 21.22.63
 long: 103.42.23
 alt: 250

General description: rural house + buffalo farm + coffee trees
 (use, farm, rural area, village, cave...)
Jack fruit
mountain

Animals: (yes/no) Y
 Density: (high/mid/low) Y
 if yes, detail: dog, buffalo, cat
 (species, health status...)
chickens

Humans: (yes/no) Y
 if yes, detail: 6 (2 children)
 (n° of persons, activity...)
Thai

Environmental description: rural house, coffee trees, banana forest,
 (forest, type of vegetation, crohabitats, burrows, rocks, river...)
buffalo

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2...)	Localisation	Problems with traps	Σ F
<u>buffalo pen CDC 1</u>		<u>buffalo</u>		<u>1</u>
<u>cave 1 CDC 2</u>		<u>rock</u>		<u>4</u>
<u>cave 2 CDC 3</u>		<u>cave</u>	<u>using leaf</u>	<u>1</u>
<u>cave 3 CDC 4</u>				
				<u>6 13</u>

flab
 OK
 OK
 OK
 OK

Σ = 13

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number: 6
 Site: 12/10
 Station n°/name: 1.10
 Gatherer: Jimmy
 Date: 3/16
 Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Lò Văn Tiến
 Locality: (province/town/village)
 GPS lat: 21° 20' 6.70
 long: 103° 01' 24.7
 alt: 216
 Locality: (use, farm, rural area, village, cave...)
 Bàu Lát, Mũi Núi Lơ, Sơn La

General description: wood house, coffee garden, mountain,
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) y
 Density: (high/mid/low) L
 if yes, detail: dog, buffalo, chicken
 (species, health status...)

Humans: (yes/no) y
 if yes, detail: 4
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: coffee, ya la forest, mango, bamboo
 (forest, type of vegetation,
 microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed:
 Give some details on ST location:
 Number of Sticky Traps collected:
 Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 3 Cave CDC 1 Cave CDC 2 Under house CDC 3	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps
			SE SF lab
			10
			4
			5
			Σ 19 (Σ = 19)

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 12/12/08
 Station n°/name: 1.1.1
 Weather: sunny
 Time: 3h

Head of mission: _____
 Team: _____

MATERIAL INFO

Landlord's name: Lũ Văn Ut

Locality: (province/town/village) Bà Rịa, Mũi Né commune, Thôn Chín 4 xã
 GPS lat: 21° 20' 5.21"
 long: 102° 21' 9.61"
 alt: 2.19

General description: wood house + buffalo farm, mountain
 (note, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no)
 Density: (high/mid/low)
 if yes, detail: dog, buffalo, goat, duck, chicken
 (species, health status...)

Humans: (yes/no)
 if yes, detail: 4
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: loggia, forest tree, bamboo tree, creek, wood house
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>6</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	lab
<u>Cave 1 CDC 1</u>				<u>1</u>	
<u>buffalo CDC 2</u>				<u>0</u>	
<u>Cave 2 CDC 3</u>				<u>1</u>	
<u>Cave 3 CDC 4</u>				<u>2</u>	
<u>under floor CDC 5</u>			<u>Battery off</u>	<u>2</u>	
<u>Cave 4 CDC 6</u>					
				<u>Σ 9</u>	<u>Σ = 9</u>

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 13/10/2011
 Station n°/name: 2113
 Gatherer: Choung
 : 29°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Li Văn Xong

Locality: (province/town/village) _____ GPS lat: 21° 22' 33.2"
Tiên Sơn, Chiềng Xôm commune, Siala city, Siak province long: 103° 54' 32.1"
 alt: 525 m

General description: urban house next mountain
 (house, farm, rural area, village, cave,...)

Animals: (yes/no) ✓ if yes, detail: chicken, pig, duck
 Density: (high/mid/low) low (species, health status,...)

Humans: (yes/no) ✓ if yes, detail: 4 (2 children)
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: urban house next bamboo forest + mountain
 (forest, type of vegetation, logans,
 microhabitats, burrows, rocks, river,...)

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____ Number of Sticky Traps collected: _____
 Give some details on ST location: _____ Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>2g</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SE	Tab
<u>rock 1 CDC 1</u>				0	
<u>rock 2 CDC 2</u>				0	
<u>under house CDC 3</u>				2	2
<u>duck place CDC 4</u>				0	
				<u>2/</u>	<u>(2=2)</u>

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...) _____

Mission number: 6
 Date: 13/10/2016
 Station n°/name: S.119
 Weather:
 Head of mission:
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: Ng. Duong Hien
 Locality: (province/town/village) Mu Banlet, Ching Xom community, Stacay, Lao
 GPS lat: 21.22.97.1
 long: 107.54.89.0
 alt: 586.m

General description: bamboo house + pigeon farm + mountain
 (use, farm, rural area, village, cave,...)

Animals: (yes/no) / if yes, detail: pigeon + chicken
 Density: (high/mid/low) H (species, health status,...)

Humans: (yes/no) / if yes, detail: 4 (Kinh)
 (n° of persons, activity,...)

Environmental description: much bamboo house, much, cave, pigeon farm
 (forest, type of vegetation, microhabitats, burrows, rocks, river,...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: <u>5</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Lab
door cave 1 CDC 1				1	
deep cave 2 CDC 2				6	
door cave 3 CDC 3				4	
cave CDC 4 CDC 4				4	
house CDC 5				0	
				<u>Σ 15</u>	<u>(Σ = F)</u>

GENERAL COMMENTS

(All important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 13/09/2016
 Station n°/name: 5915
 Weather: cloudy
 Temp: 30.6

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: Hu Van Thao

Locality: (province/town/village) Huynh Tamlet, Chieng Xom commune, St. Louis
 GPS lat: 21.23.052
 long: 103.59.921
 alt: 585m

General description: wood house + rock mountain + duck, chicken, pig farm
 (house, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y
 Density: (high/mid/low) M
 if yes, detail: pig, chicken, duck
 (species, health status, ...)

Humans: (yes/no) Y
 if yes, detail: 2
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: wood house, street, rural area, animal farm
 (forest, type of vegetation, rocky, small cave, ...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: _____
 Give some details on ST location: _____
 Number of Sticky Traps collected: _____
 Specific remarks on density of sand flies: _____

Number of CDC: <u>4</u>	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SE	Lab
<u>cave CDC 1</u>				<u>2</u>	
<u>cave CDC 2</u>				<u>14</u>	
<u>cave CDC 3</u>				<u>16</u>	
<u>pig house CDC 4</u>				<u>2</u>	
				<u>Σ 39</u>	<u>Σ 39</u>

GENERAL COMMENTS

(fill important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 27/10/16
 Station n°/name: S116
 Weather: cloudy
 : 27°C

Head of mission: Yen
 Team: Tu, Yen, Son, Phay, Thany

STATION INFO

Landlord's name: Tông Thị Xuân
 Locality: (province/town/village) Phước Hải, huyện Chiêm Khê, commune, Slativity, Slapaa
 GPS lat: 21° 24' 0.1"
 long: 102° 55' 25.8"
 alt: 52m

General description: house + rocky mountain + pig place
 (use, farm, rural area, village, cave...)

Animals: (yes/no) Y if yes, detail: pigs, dogs, duck, chicken
 (species, health status...)
 Density: (high/mid/low) Y

Humans: (yes/no) Y if yes, detail: 6 (2) children, Thai (1) woman
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: house near to mountain + caves, animal place, bamboo, jack fruit, banana
 (forest, type of vegetation, crohabitats, burrows, rocks, river...)

RAP INFO

Number of Sticky Traps installed: Number of Sticky Traps collected:
 Give some details on ST location: Specific remarks on density of sand flies:

Number of CDC: 5	N° (1,2,...)	Localisation	Problems with traps	SF	Lab
CAVE CDC 1				8	
CAVE CDC 2				0	
CAVE CDC 3				1	
pig/ha CDC 4				7	
inside house CDC 5			battery off	0	
				<u>Σ 16</u>	<u>Σ 16</u>

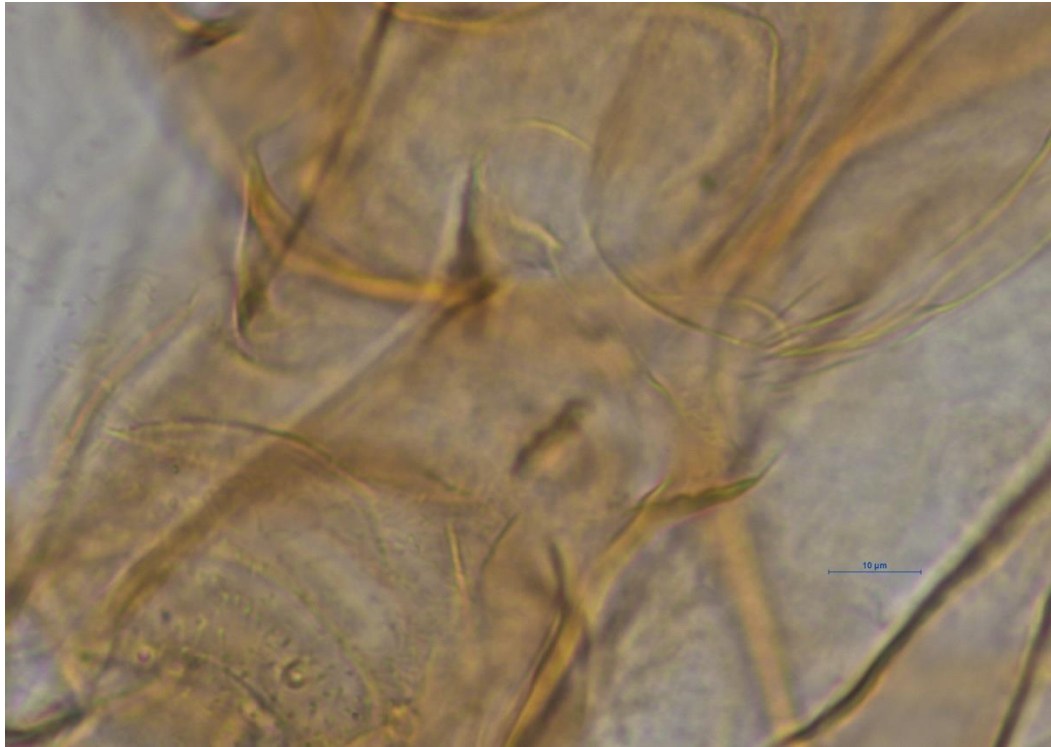
GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...)

Mission 6: SonLa

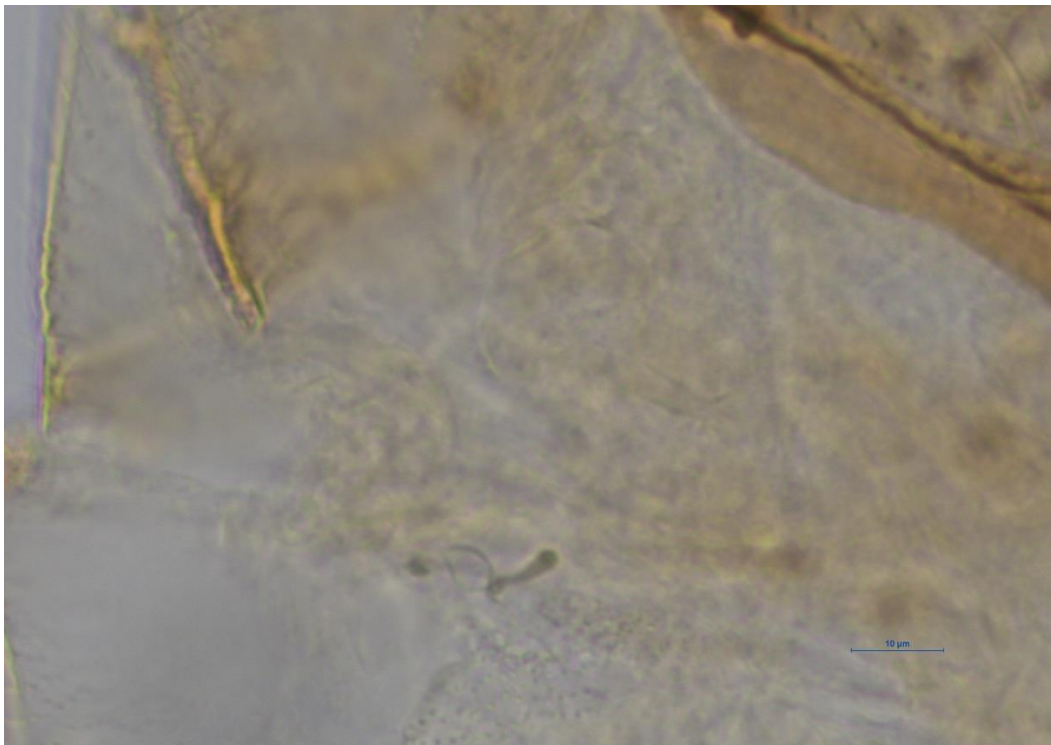
Day 1 :	300	3/3
Day 2 :	47	1/8
Day 3 :	53	5/3
Day 4 :	72	7/2

SF : 472 486
 Mission 6

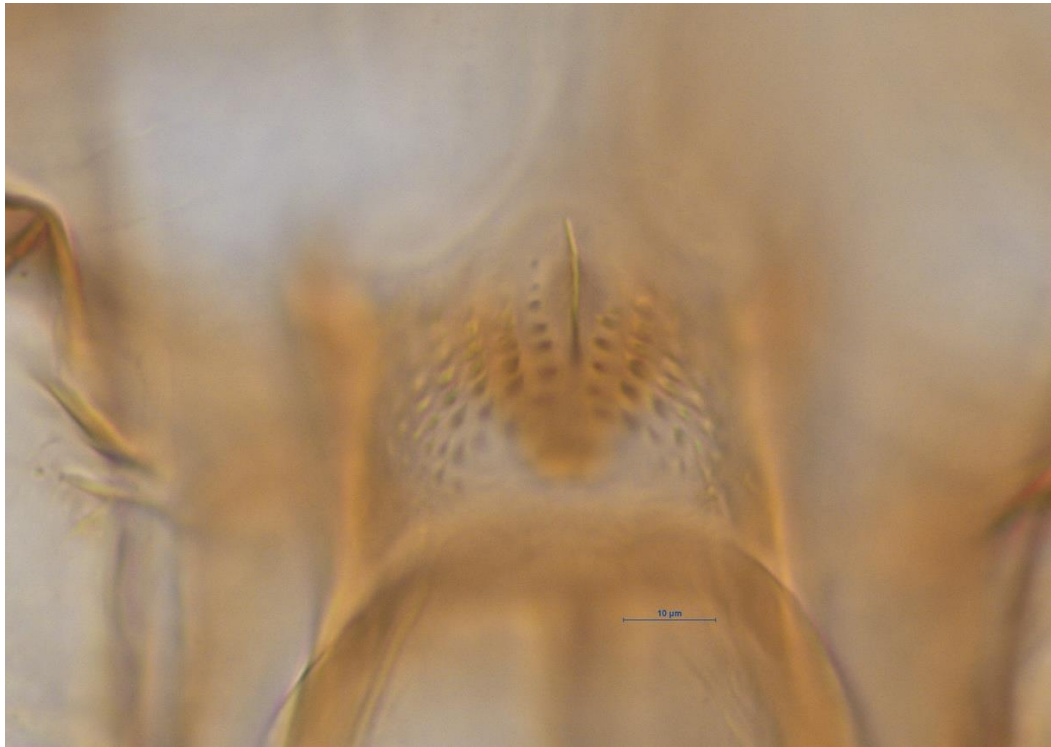
Phụ lục 02: Hình ảnh chụp tiêu bản muối cát



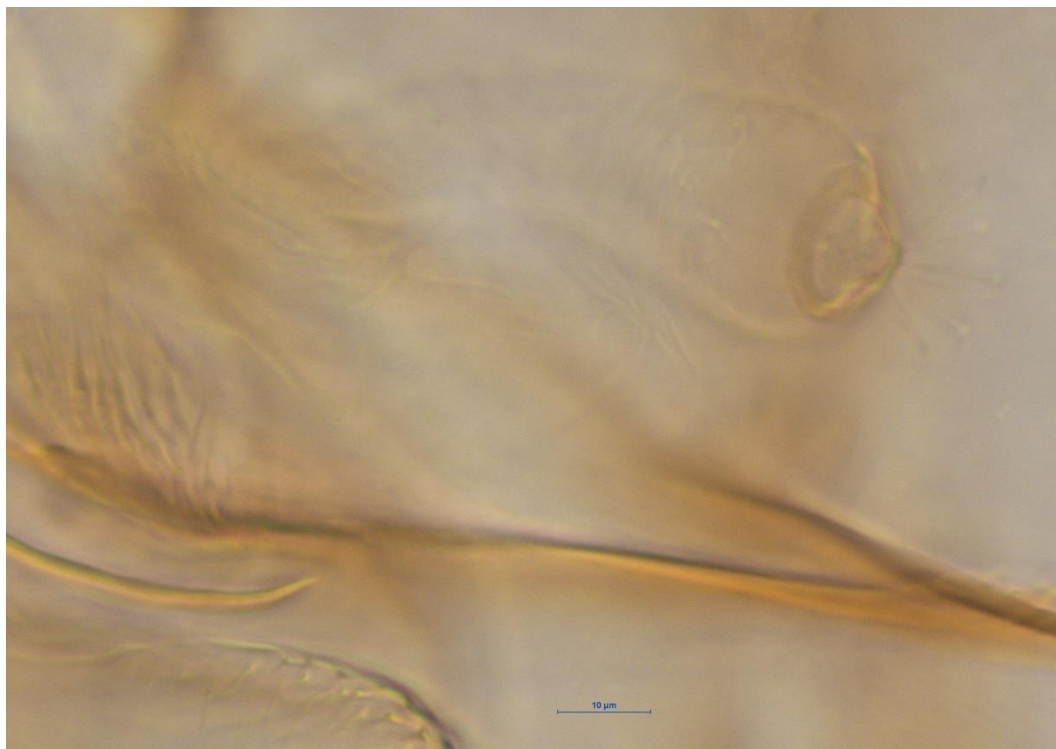
Hàm của *Ch. junlianesis* chụp ở vật kính x60



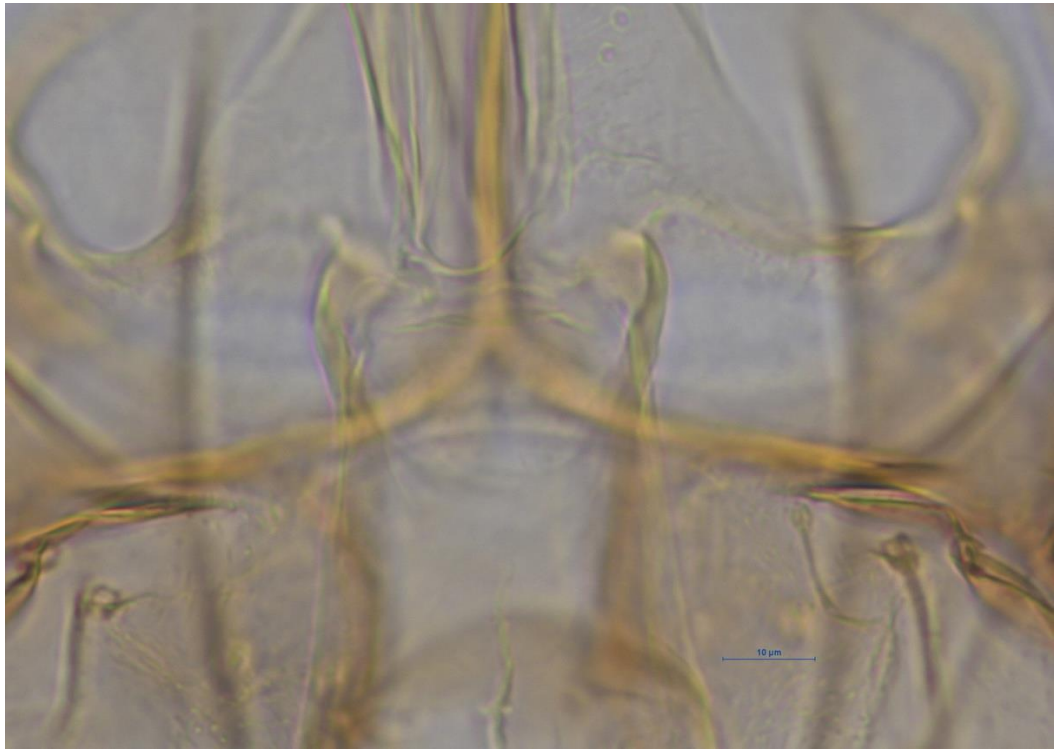
Túi chứa tinh của *Ch. junlianesis* chụp ở vật kính x60



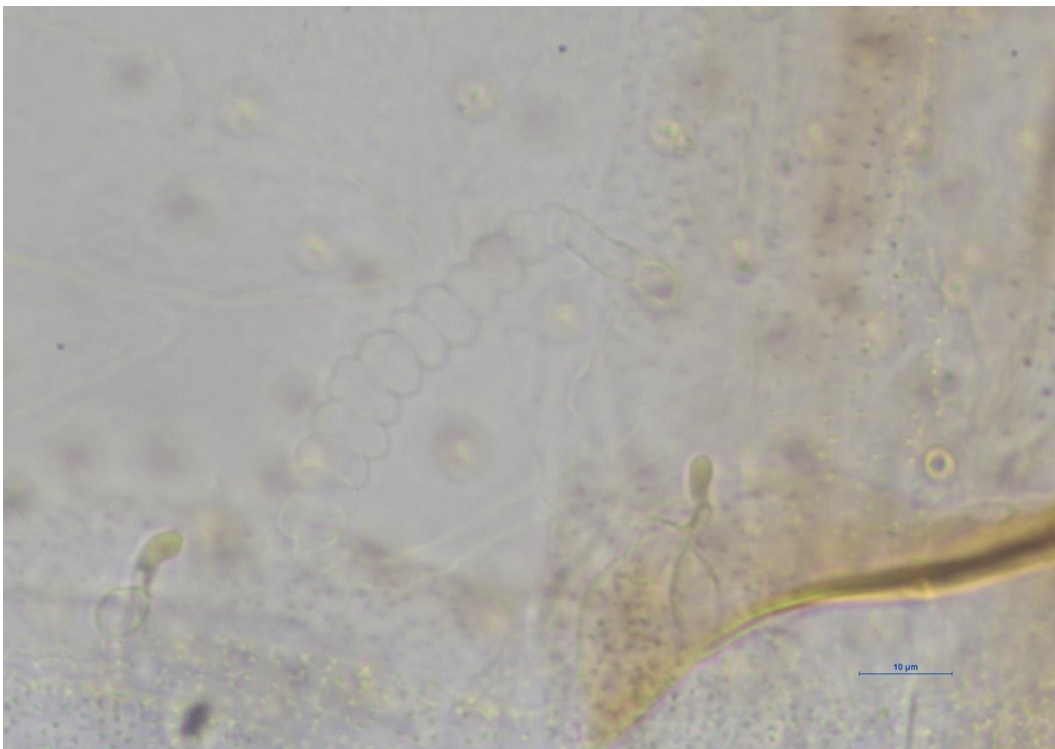
Hàm của *Id. longiforceps* chụp ở vật kính x60



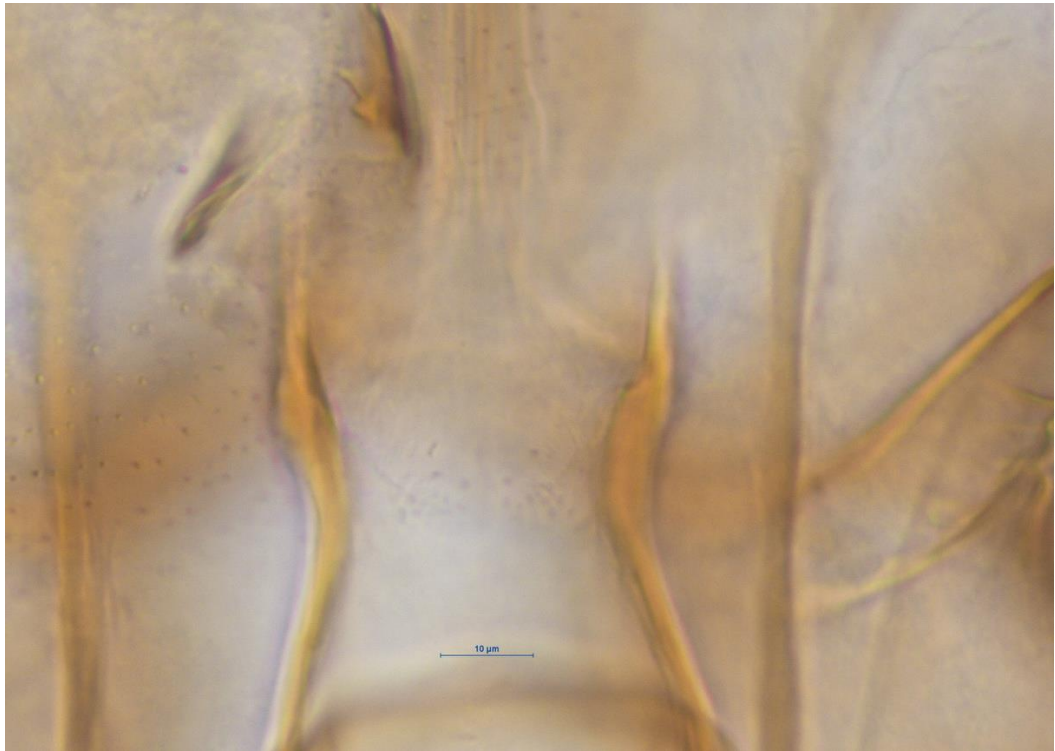
Túi chứa tinh của *Id. longiforceps* chụp ở vật kính x60



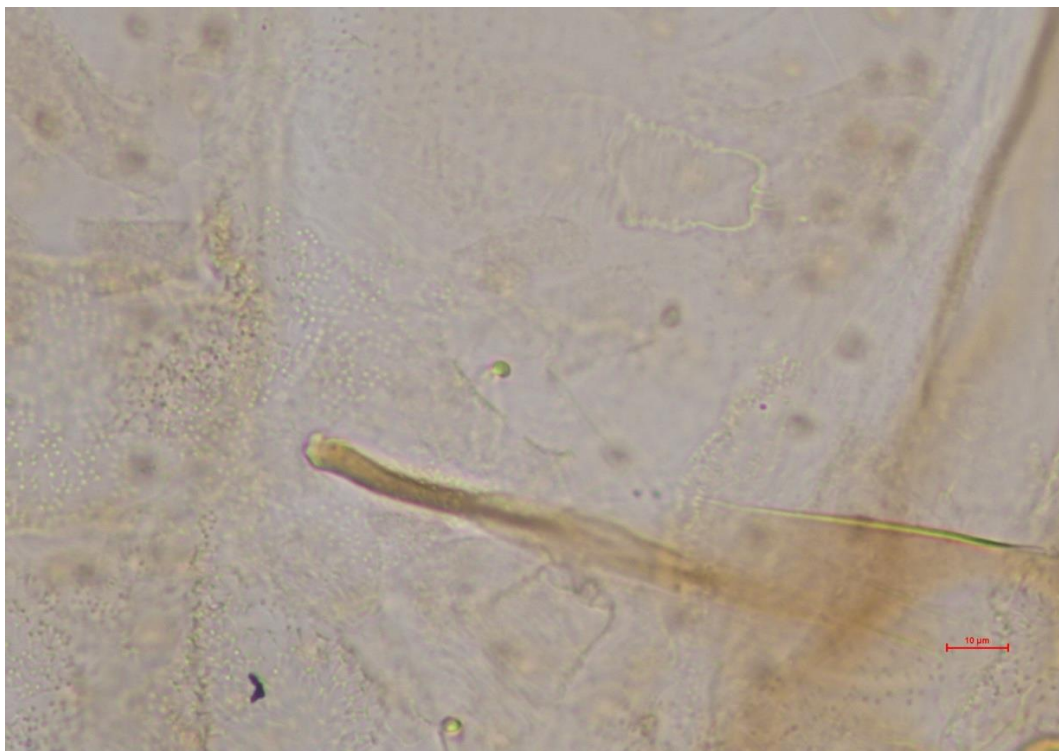
Hàm của *Ph. betisi* chụp ở vật kính x60



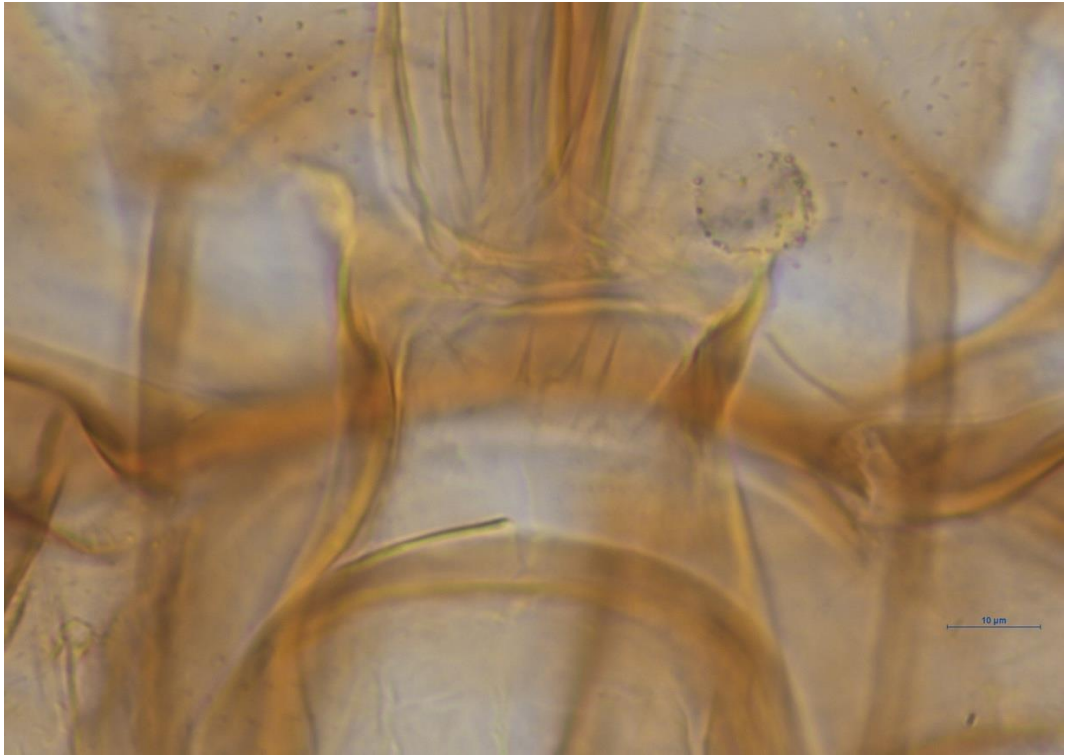
Túi chứa tinh của *Ph. betisi* chụp ở vật kính x60



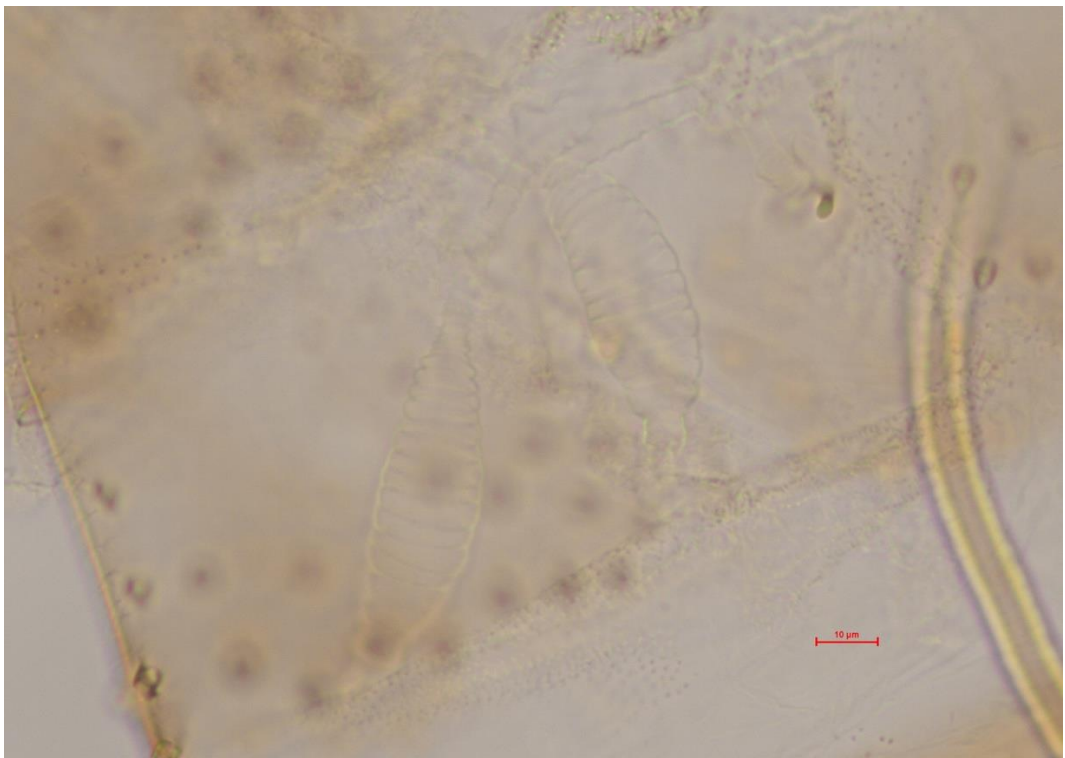
Hàm của *Ph. mascomai* chụp ở vật kính x60



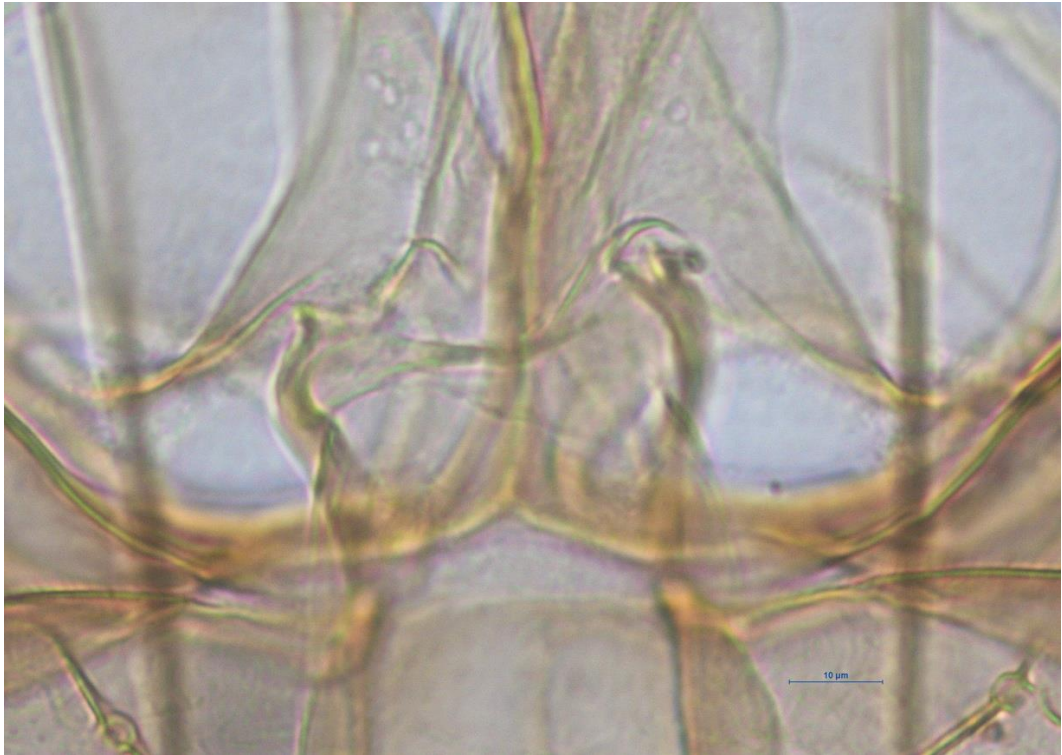
Túi chứa tinh của *Ph. mascomai* chụp ở vật kính x40



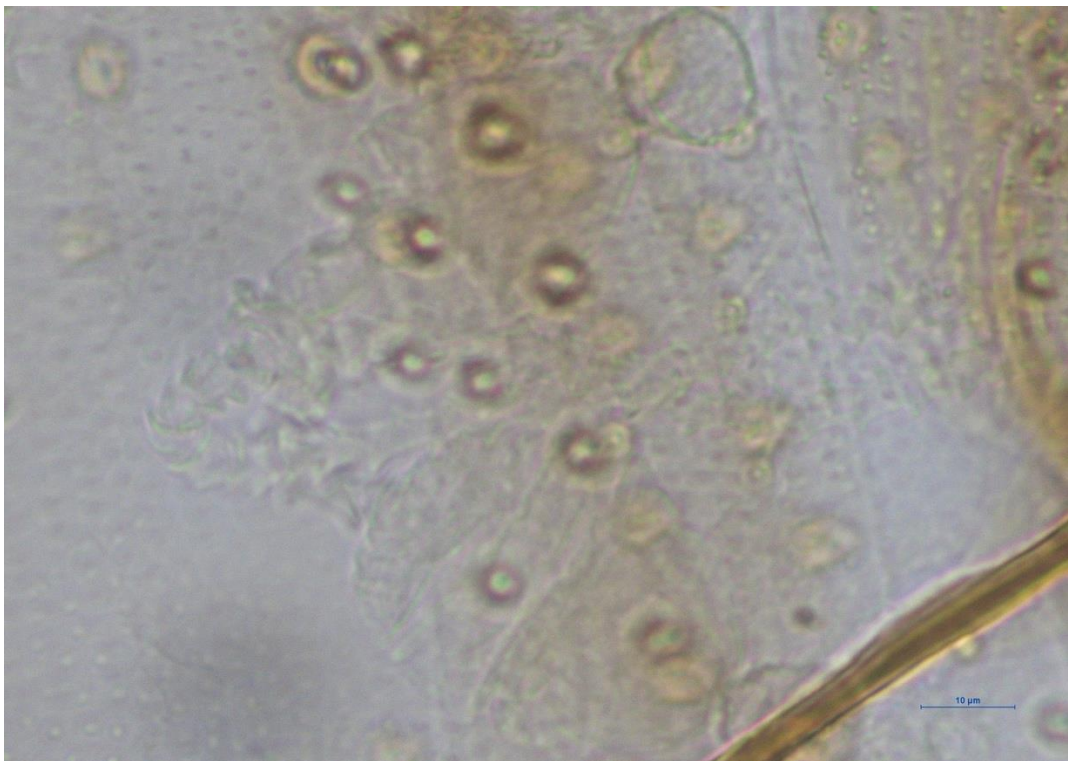
Hàm của *Ph. stantoni* chụp ở vật kính x60



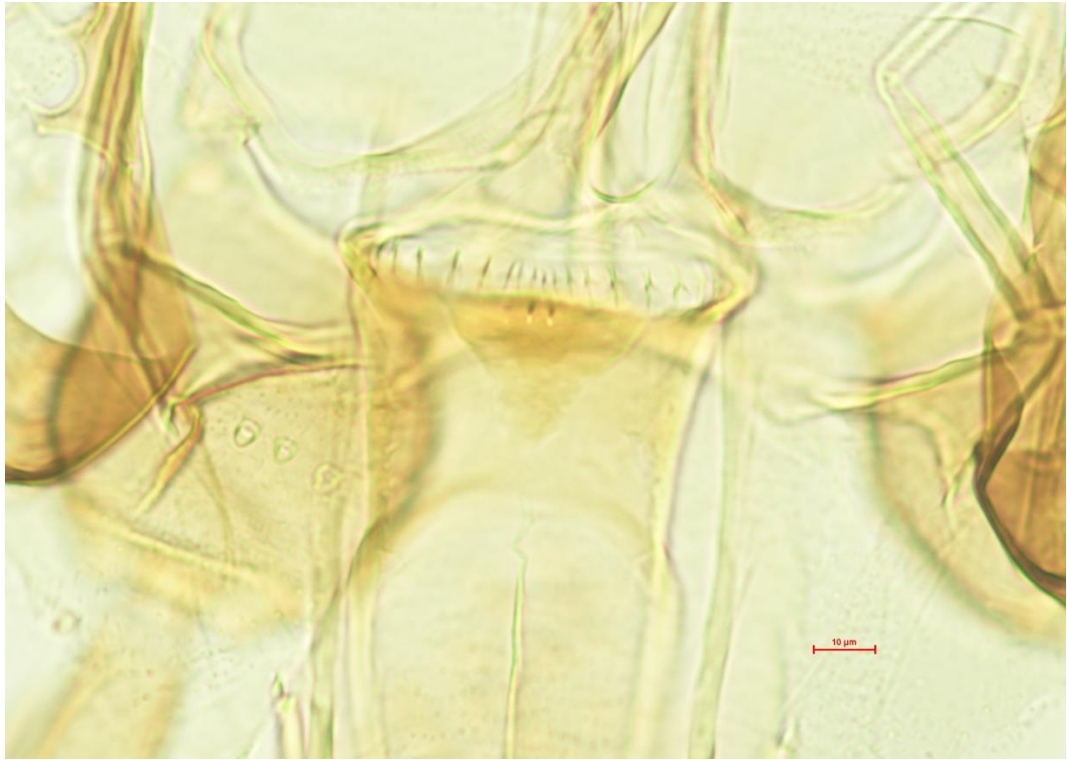
Túi chứa tinh của *Ph. stantoni* chụp ở vật kính x40



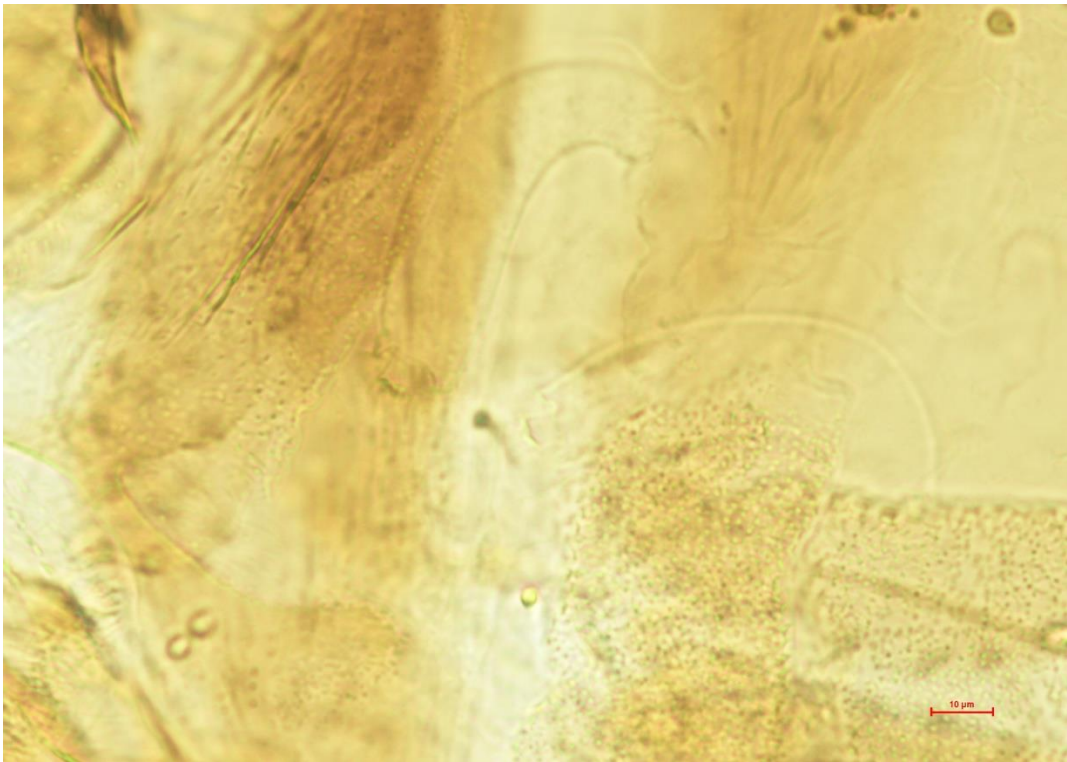
Hàm của *Ph. yunshengensis* chụp ở vật kính x60



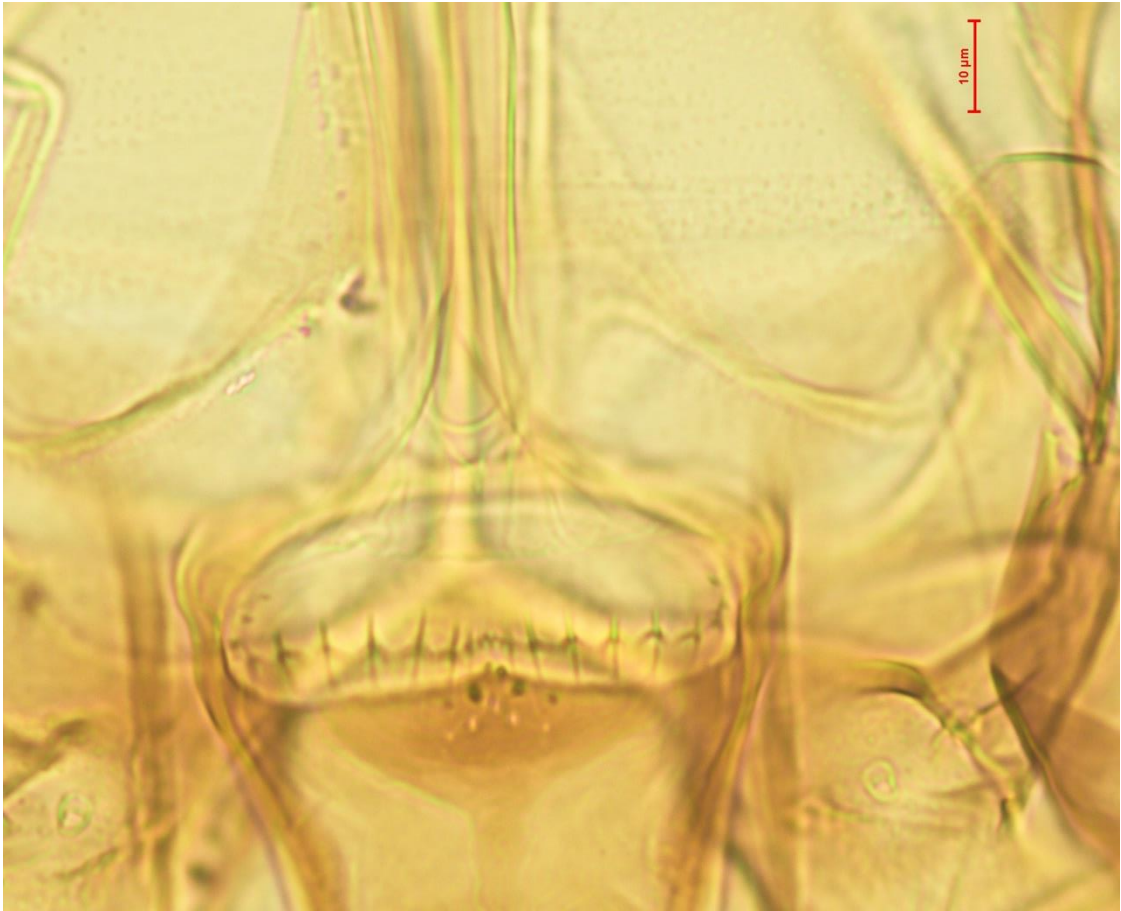
Túi chứa tinh của *Ph. yunshengensis* chụp ở vật kính x60



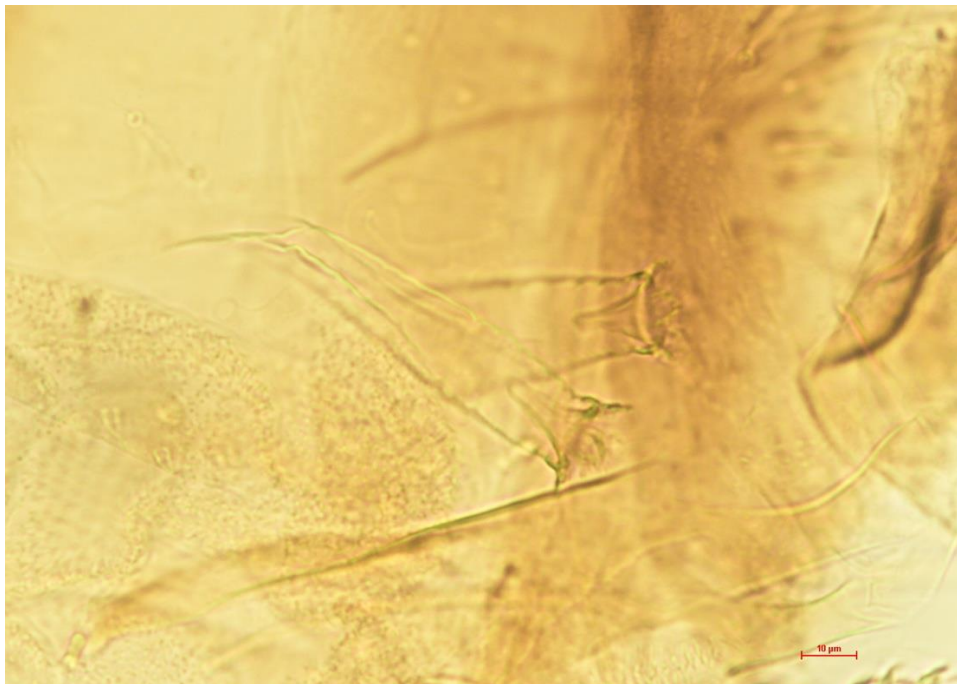
Hàm của *Se. hivernus* chụp ở vật kính x40



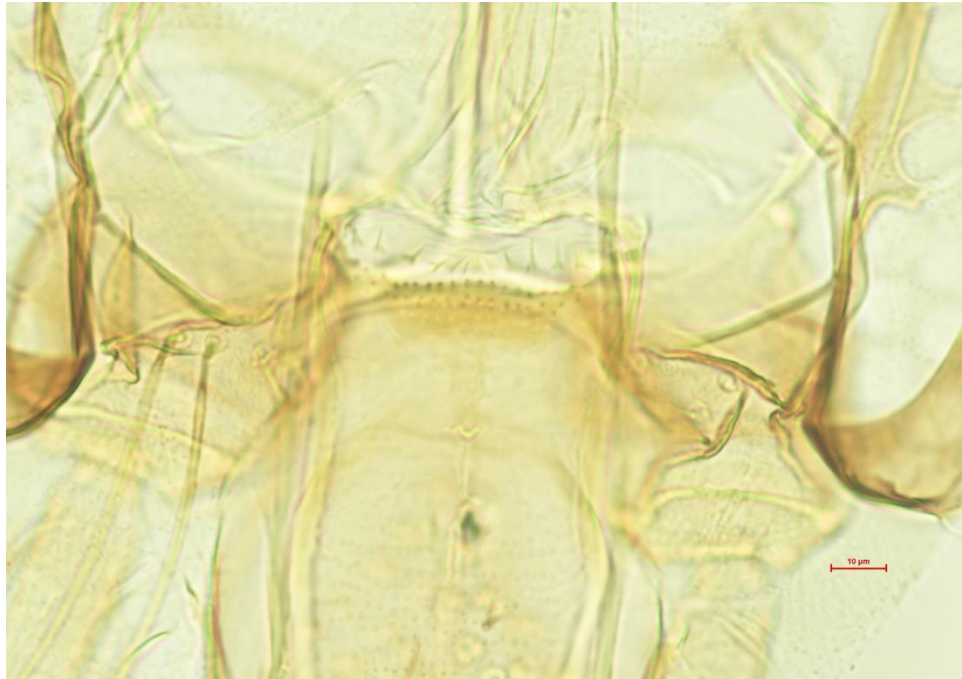
Túi chứa tinh của *Se. hivernus* chụp ở vật kính x40



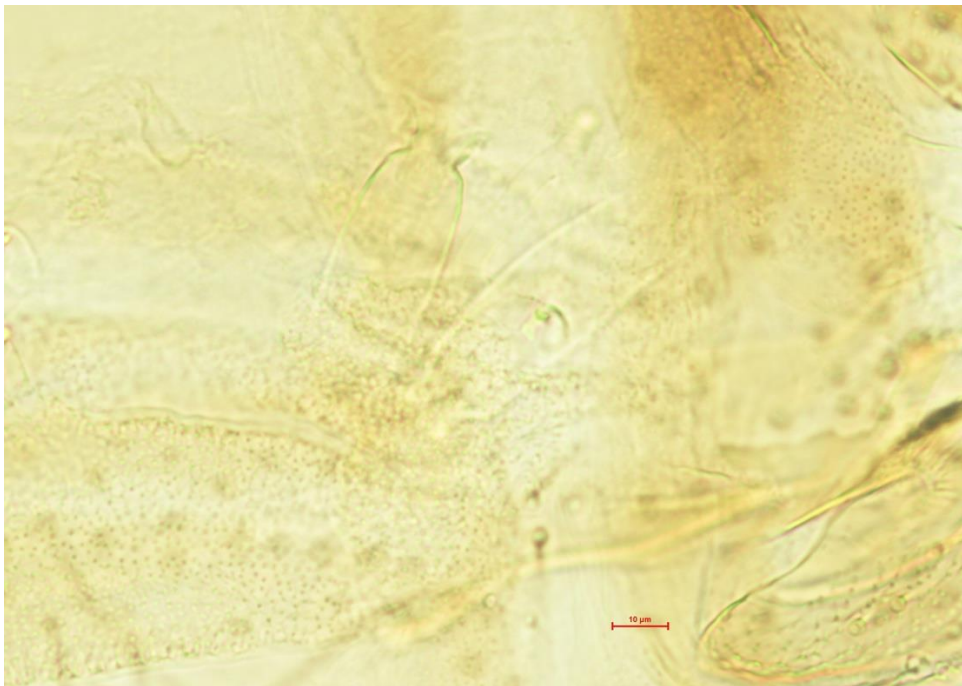
Hàm của *Se.khawi* chụp ở vật kính x40



Túi chứa tinh của *Se.khawi* chụp ở vật kính x40



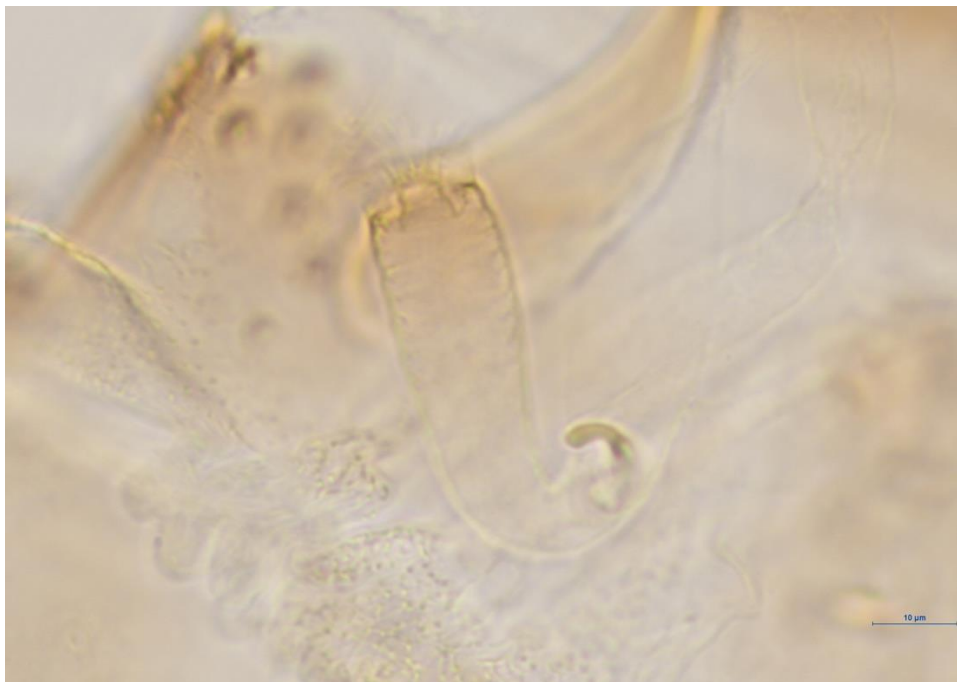
Hàm của *Se.pertuban* chụp ở vật kính x40



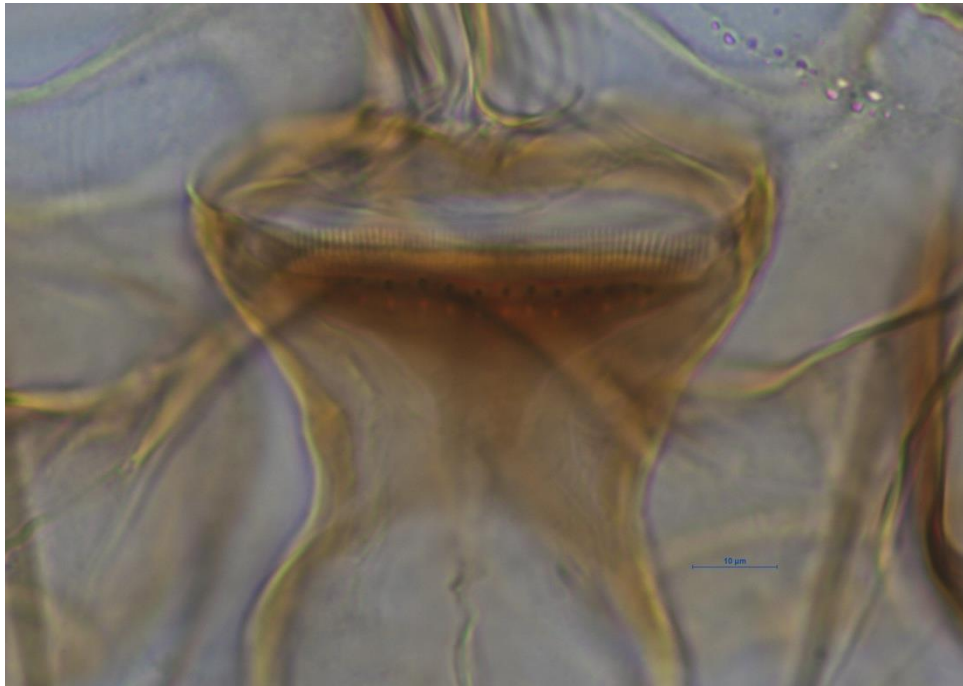
Túi chứa tinh của *Se.pertuban* chụp ở vật kính x40



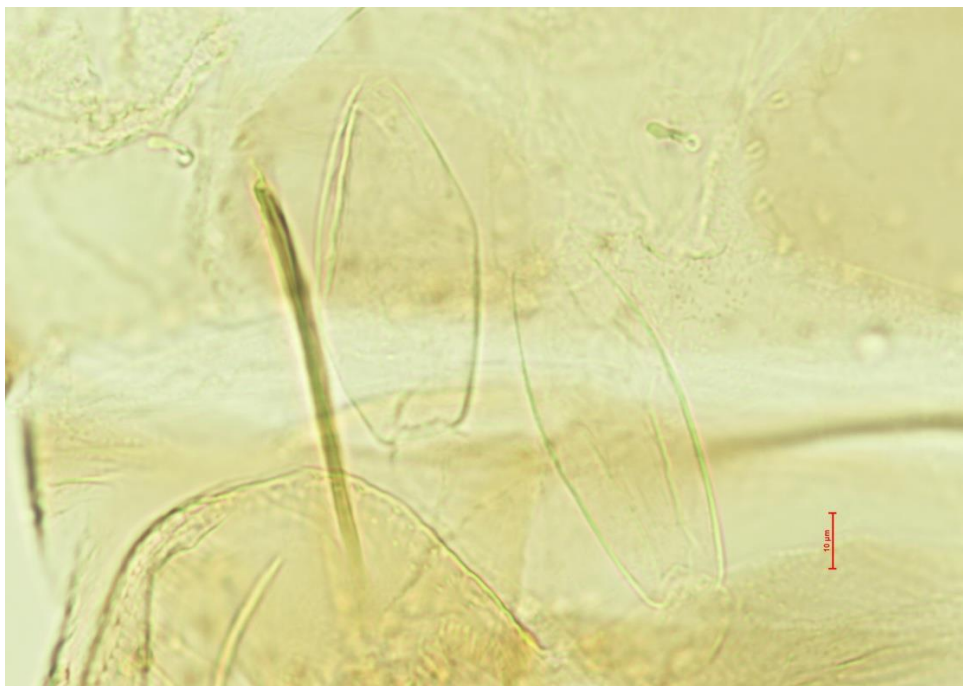
Hàm của *Se.2* chụp ở vật kính x40



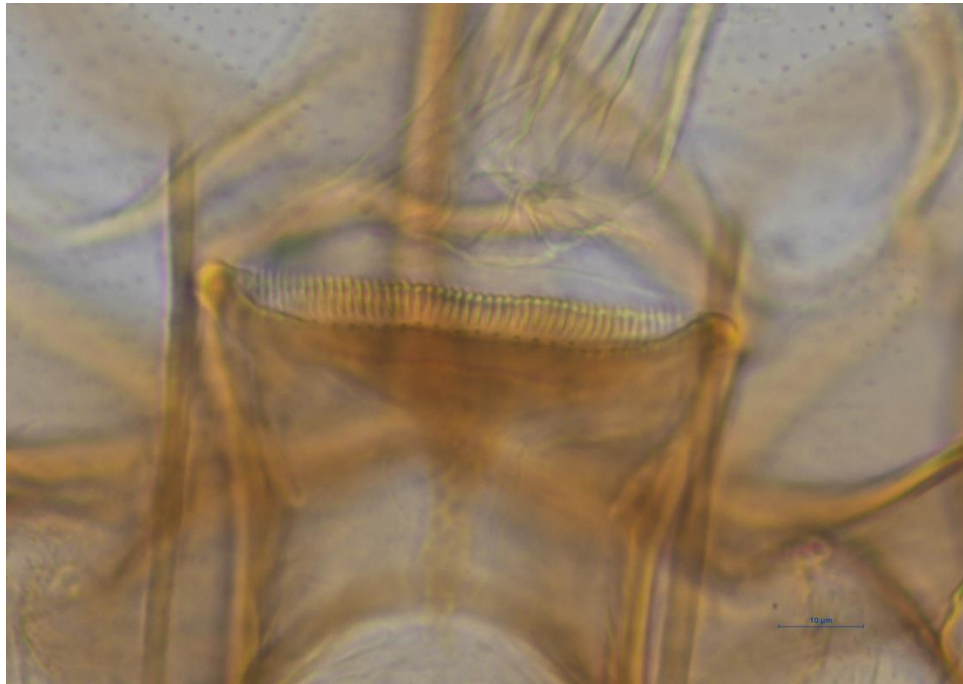
Túi chứa tinh của *Se.2* chụp ở vật kính x40



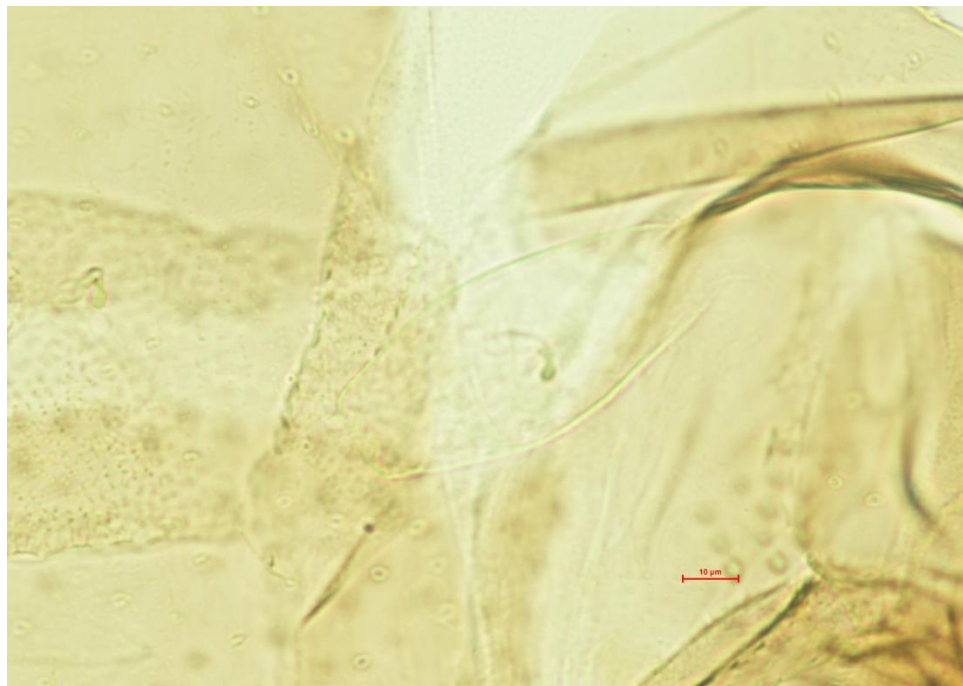
Hàm của *Se. barraudi* chụp ở vật kính x60



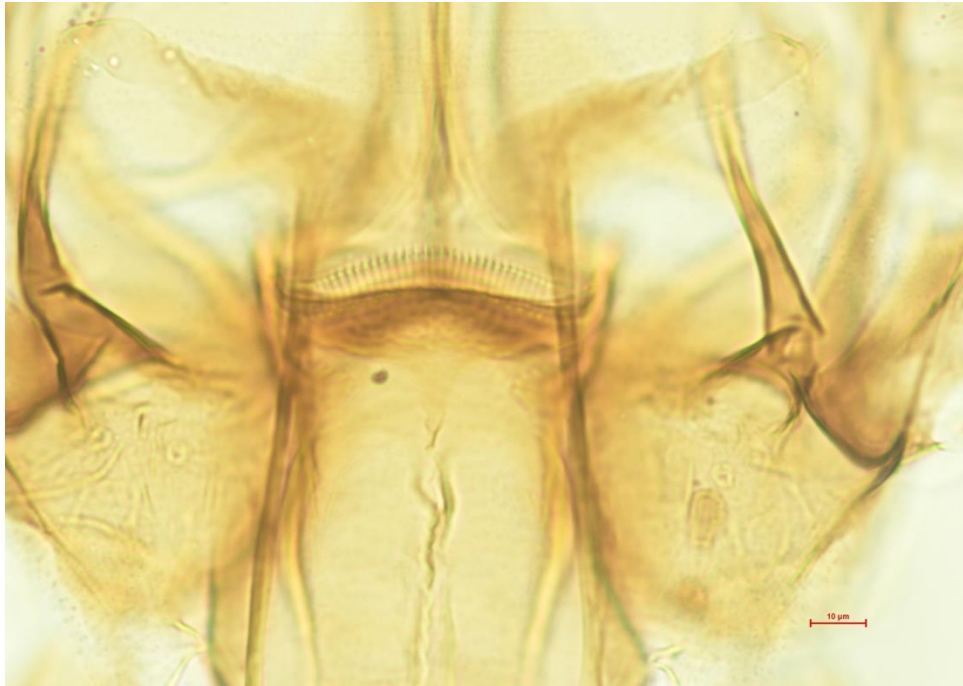
Túi chứa tinh của *Se. barraudi* chụp ở vật kính x40



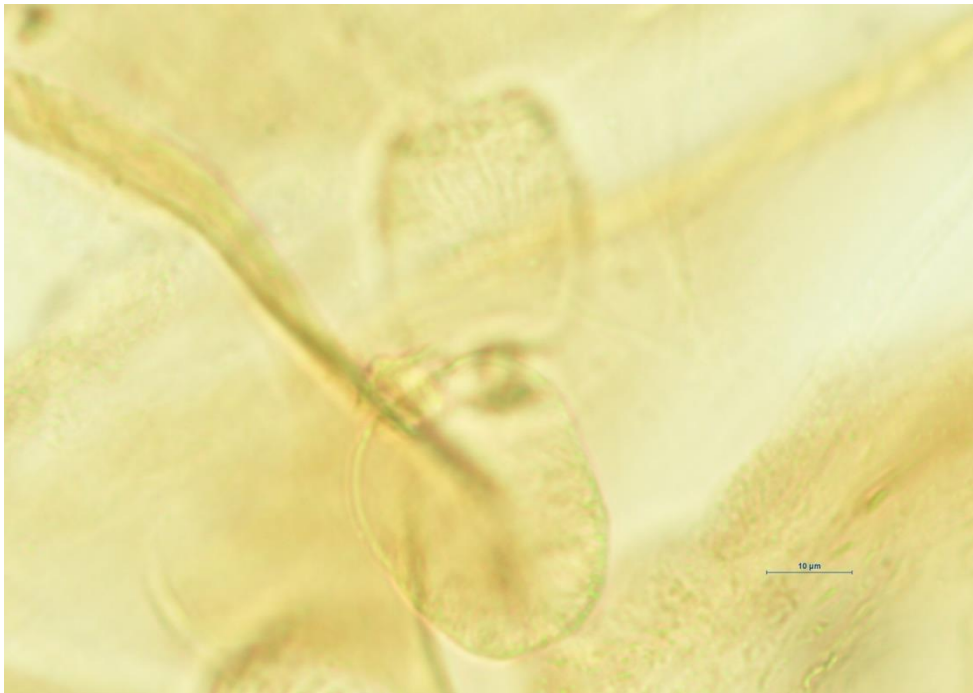
Hàm của *Se. brevicaulis* chụp ở vật kính x60



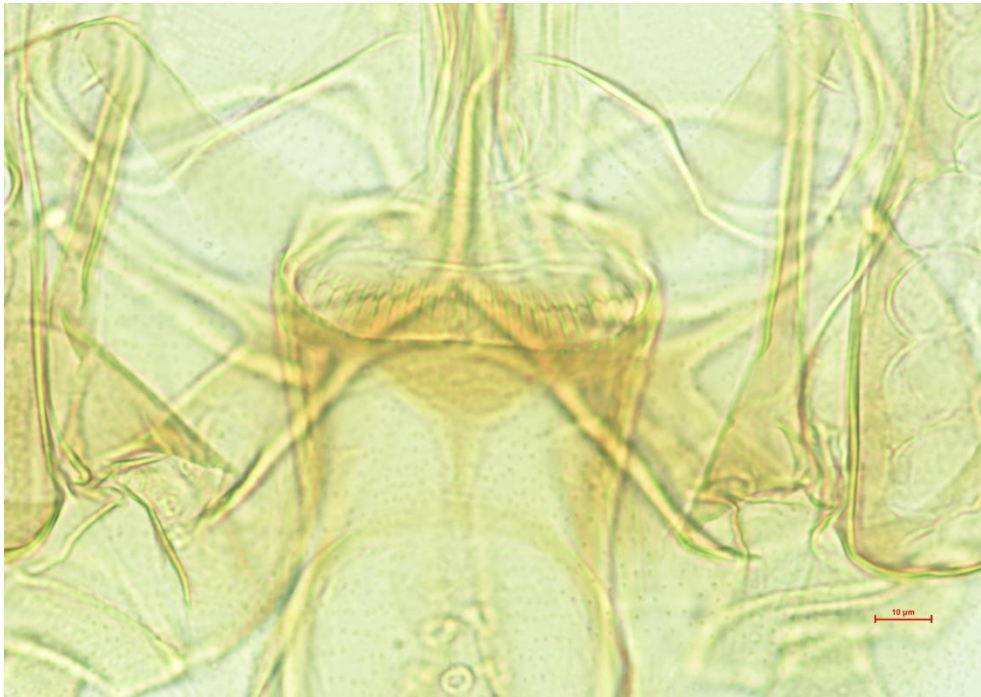
Túi chứa tinh của *Se. brevicaulis* chụp ở vật kính x40



Hàm của *Gr. indica* chụp ở vật kính x40



Túi chứa tinh của *Gr. indica* chụp ở vật kính x60



Hàm của *Se. sp3* chụp ở vật kính x40



Túi chứa tinh của *Se. sp3* chụp ở vật kính x10