

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

TRẦN HẢI SƠN

**THÀNH PHẦN LOÀI, PHÂN BỐ CỦA MUỖI CÁT
(DIPTERA: PSYCHODIDAE) VÀ
THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS VÀ
LEISHMANIA TẠI 6 TỈNH MIỀN BẮC VIỆT NAM**

**Chuyên ngành
Mã số**

**: VI SINH VẬT HỌC
: 62 42 01 07**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

- 1. TS. Trần Vũ Phong**
- 2. PGS.TS. Nguyễn Lê Khánh Hằng**

Hà Nội, 2024

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 2024
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 2024

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 | 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. Bệnh do Leishmania 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 Leishmania 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..... | 112 |
| Kết luận | 113 |

| | |
|---|-----|
| Khuyến nghị | 115 |
| Danh mục các bài báo đã công bố..... | 116 |
| Tài liệu tham khảo | 119 |
| 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 | 19 |

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 RNA 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 tủy 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: Khởi trình tự bảo tồn | 37 |
| Hình 1.19. | Bệnh do Leishmania được tổng hợp tại Trung Quốc 2004-2010 | 44 |
| Hình 1.20. | Bệnh do Leishmania được tổng hợp tại Thái Lan 2004-2010 | 44 |
| Hình 1.21. | Bệnh do Leishmania được báo cáo tại Việt Nam | 45 |
| Hình 2.1. | Quy trình giải trình tự gen NGS với mẫu dương tính với nhóm leishmania | 61 |
| 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 | 111 |

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 | RNA | Ribonucleic acid | Axit ribonucleic |
| 3 | AVL | Anthroponotic visceral Leishmaniasis | Bệnh do Leishmania nội tạng nguồn lây từ con người |
| 4 | CAP | Capsid | Vỏ bọc |
| 5 | CHIKV | Chikungunya virus | Vi rút Chikungunya |
| 6 | CL | Cutaneous Leishmaniasis | Bệnh do Leishmanias 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 do Leishmania 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 do Leishmania nội tạng |
| 27 | rDNA | Ribosome DNA | DNA ribosome |
| 28 | rRNA | Ribosome RNA | RNA 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 do Leishmania 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 do *Leishmania* gây ra, 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 RNA 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). RNA 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 do *Leishmania* 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 do Leishmania 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 do Leishmania 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 **"Thành phần loài, phân bố của Muỗi cát (diptera: psychodidae) và thực trạng nhiễm Flavivirus và 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 Phlebotomine 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.

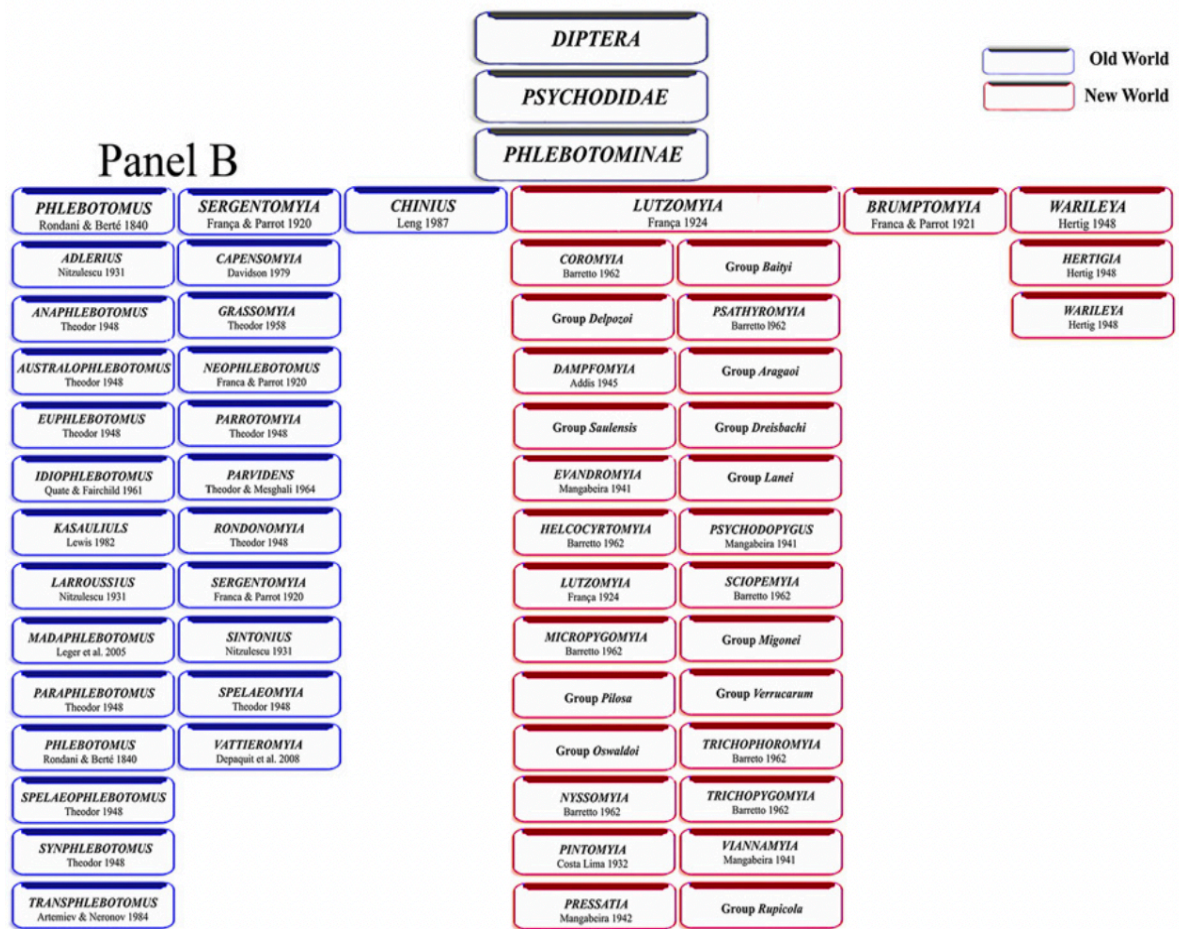
Lịch sử của phân loại muỗi cát có thể được chia thành hai thời kỳ riêng biệt. Trong thời kỳ đầu tiên, các đơn vị phân loại được phân biệt dựa trên việc phân tích các cấu trúc nhất định bên ngoài (cấu trúc của cơ quan sinh dục nam, các chỉ số gân cánh và các phép đo bên ngoài khác, được gọi là phlebotometry). 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 thể giới là *Phlebotomus* (Rondani) và *Sergentomyia* (França), và ba giống cho các loài Tân thể 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 thể giới, dựa trên một nghiên cứu hình thái học cho thấy sự phân chia của chúng thành bảy giống, bao gồm *Phlebotomus*, *Australophlebotomus*, *Idiophlebotomus*, *Spelaephlebotomus*, *Sergentomyia*, *Spelaemyia*, 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).

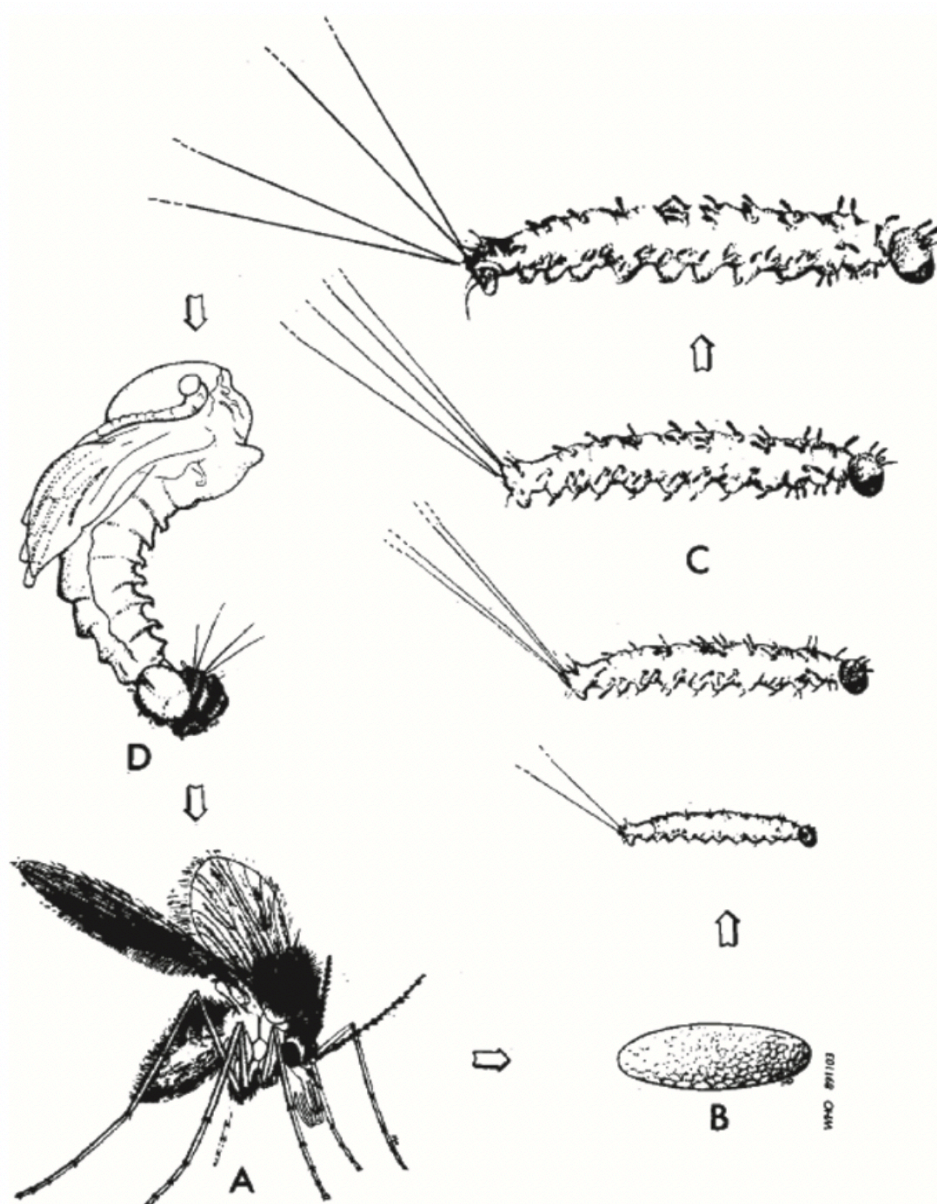


Hình 1.1. Bậc phân loại từ bộ tới phân giống của muỗi cát [29]

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 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 thể 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 thể 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 cằn. 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 cằn 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 tiểu 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*, *Phelebotomus*

(*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].

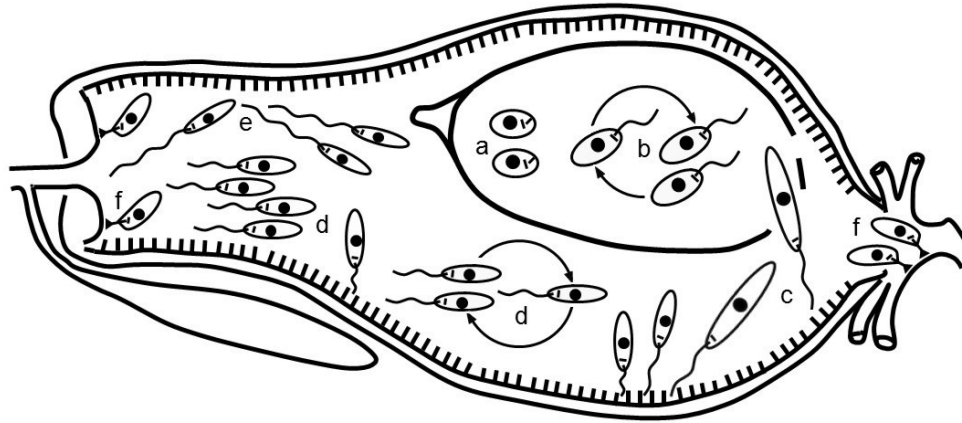
Một cuộc điều tra côn trùng bằng bẫy đèn của Thai Aurélie diễn ra từ 12/08/2002 đến ngày 02/09/2002 tại 4 địa điểm Cửa Lò (Nghệ An), Huế (Thừa Thiên Huế), Mũi Né (Bình Thuận) và Mỹ Thiên (Cần Thơ) ghi nhận 6 loài muỗi cát *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*) *stantoni*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *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 "đồng tiến hoá" 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. Mỗi 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 ở ruột giữa của 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).

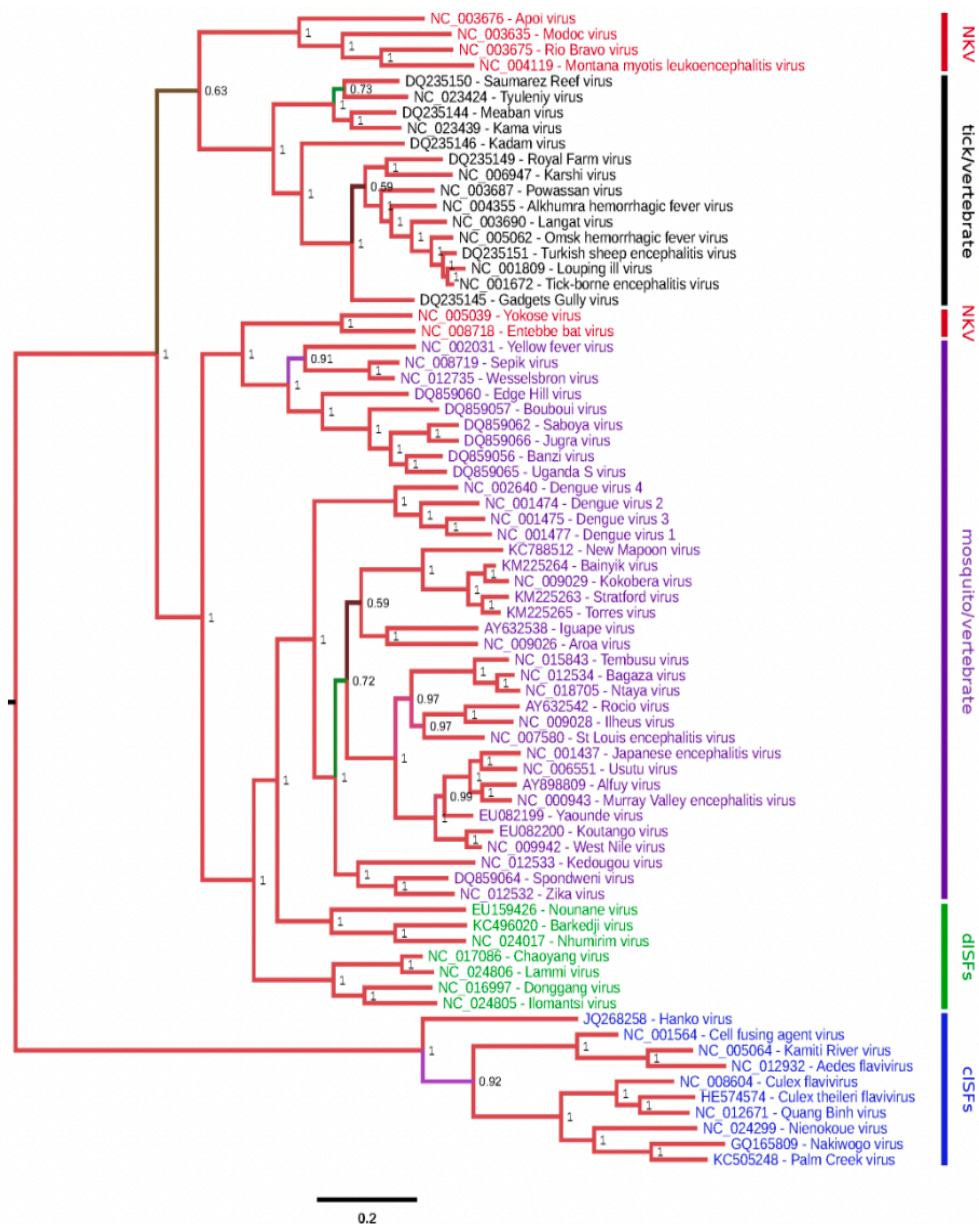
Muỗi cát là véc tơ truyền Leishmania đã được chứng minh. Năm tiêu chí do Killick-Kendrick nêu ra được yêu cầu để xác định một loài muỗi cát cụ thể là véc tơ bao gồm:

- 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 DNA 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 DNA 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 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

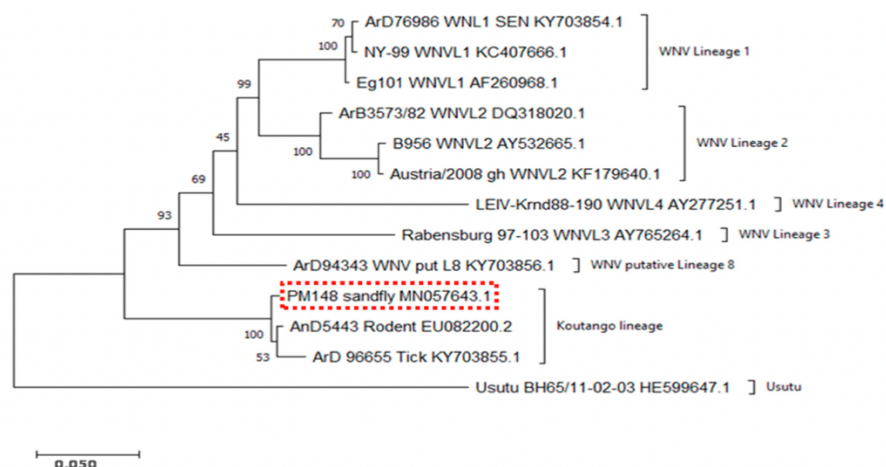
Trên cơ sở các nghiên cứu về trung hoà vi rút, các thông tin về véc tơ nhóm chân đốt – động vật có xương sống, Flavivirus được chia thành 4 nhóm chính: Flavivirus do ve/bọ truyền/động vật có xương sống (tick-borne flaviviruses-TBFVs), Flavivirus do muỗi/động vật có xương sống truyền (mosquito-borne flaviviruses -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*, *QuangBinh 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 tritaeniorhyncus* thu thập năm 2002 tại Quảng Bình (Phan Thị Ngà và cộng sự - 2009) [43, 51].

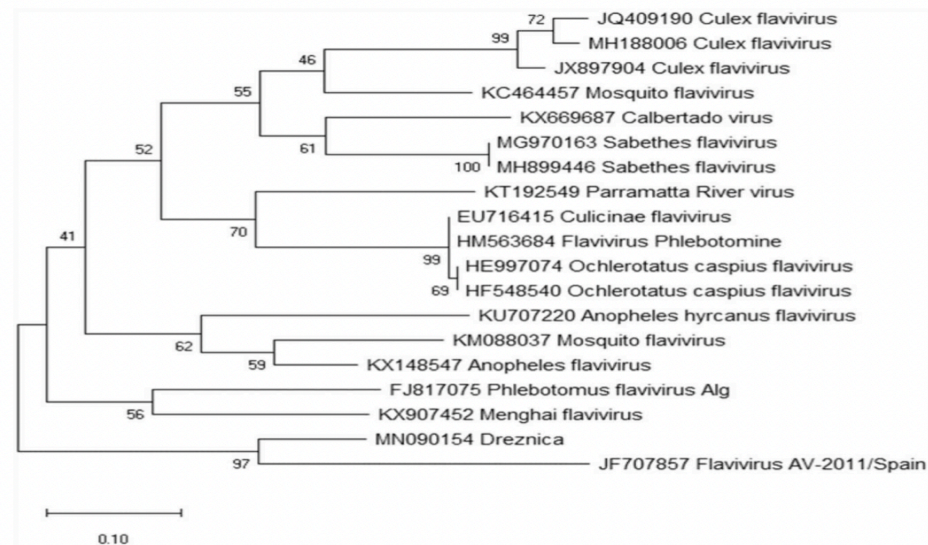
Nghiên cứu tại Niger-Châu Phi (2021) khi thu thập muỗi cát năm 2016 đã xác định được 1 pool dương tính/100 pool thực hiện (10.816 muỗi cát). Vi rút West Nile thuộc Koutango lineage (PM148 sandfly MN057643.1) được xác định bằng phản ứng miễn dịch huỳnh quang (IFA) và Realtime RT-PCR (Hình 1.6) [63, 191]. Một nghiên cứu khác của D.Fontenille (1994), 4 chủng vi rút Saboya (Soboya 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 *Tateme itempi* ở làng Saboya ở Senegal và sau đó được xác định ở loài gặm nhấm *Mastomys*, *Aivicanis 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 Flavivirus đã được phân lập từ pool 30 con muỗi cát cái của loài *Ph. abonnenci* tại Ecuador, là 1 flavivirus 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 RNA 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 mồi 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].

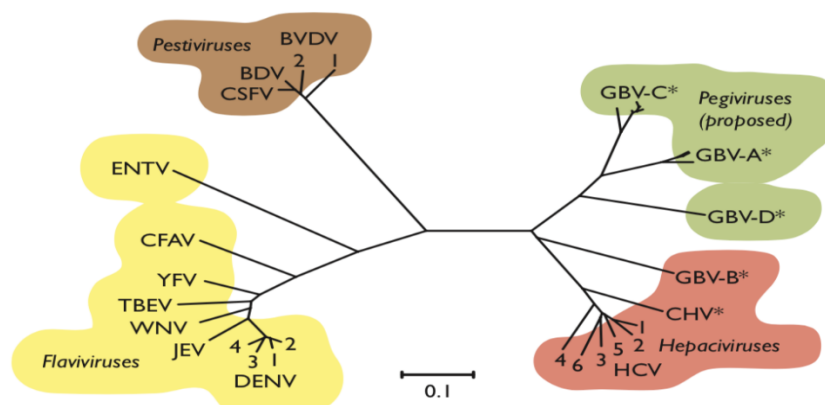
Như vậy cho đến nay, mặc dù đã xác định được một số Flavivirus hay RNA Flavivirus có liên quan đến muỗi cát, nhưng số liệu còn rất hạn chế. Vi rút Saboya được phân lập từ muỗi cát ở Senegal (1991-1992), hai trình tự Flavivirus đã được phát hiện ở loài muỗi cát *Phlebotomus perniciosus* ở Algeria (2007), EPEV ở Ecuador (2011) hay vi rút West Nile tại Niger (2016). RNA 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

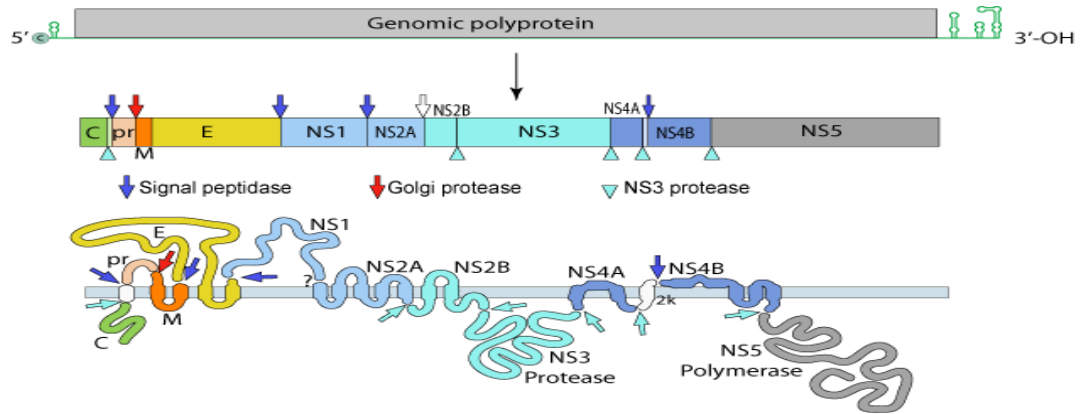
<https://basicmedicalkey.com/flaviviridae/#F1-25>)

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.

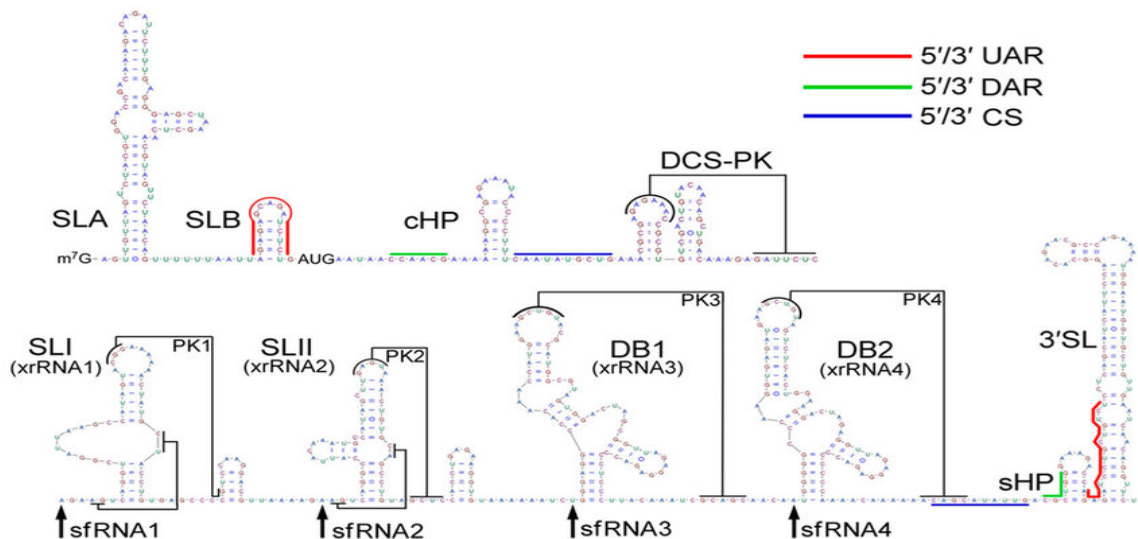
1.2.1.2. Đặc điểm hình thái và cấu trúc vật liệu di truyền nhóm *Flavivirus*

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 RNA 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 RNA của Flavivirus [76]

Đầu 5' và 3' gồm nhiều chuỗi và cấu trúc RNA 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 RNA 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 RNA 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 RNA [175].

1.2.2. Sự nhân lên của vi rút thuộc nhóm Flavivirus

Một protein tiền chất lớn được dịch mã từ các mRNA 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

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 típ, 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 RNA 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 RNA 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 RNA 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 TCYTTC 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 RNA, 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 hòa 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...)

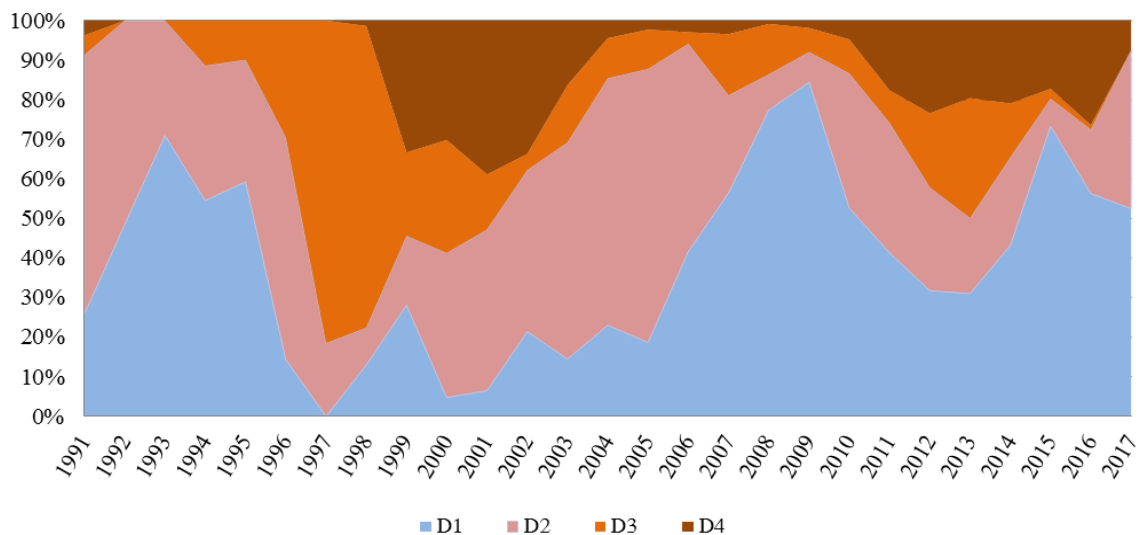
Năm 2014, tỷ lệ mắc và tử vong do VNVR tại Sơn La và Điện Biên cao nhất trong cả nước lần lượt là 17,13 ca và 18,74 ca/100.000 dân, tỷ lệ tử vong lần lượt là 1,79 ca và 0,56 ca/100.000 dân. Trong những năm trước đây, các nghiên cứu về hội chứng viêm não cấp, viêm não vi rút (VNVR) ở miền Bắc Việt Nam 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 típ 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].

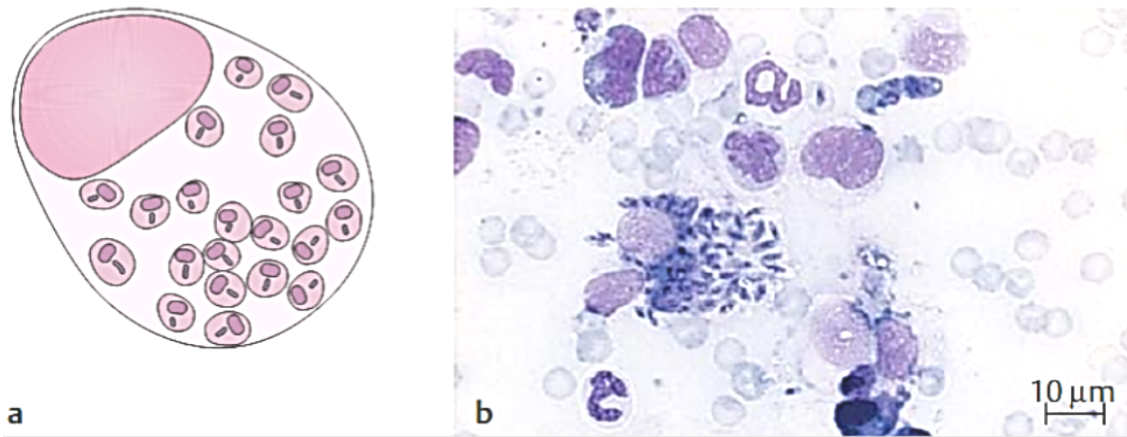
Tại Việt Nam, ZIKV lần đầu tiên được báo cáo là du khách người Israel vào năm 2015 và sau đó du khách người Hàn Quốc năm 2016. Ngoài ra, 02 trường hợp nhiễm ZIKV tại địa phương là một phụ nữ 64 tuổi tại Nha Trang và một phụ nữ 33 tuổi tại Hồ Chí Minh được báo cáo vào tháng 4 năm 2016. Tổng cộng đã có 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)

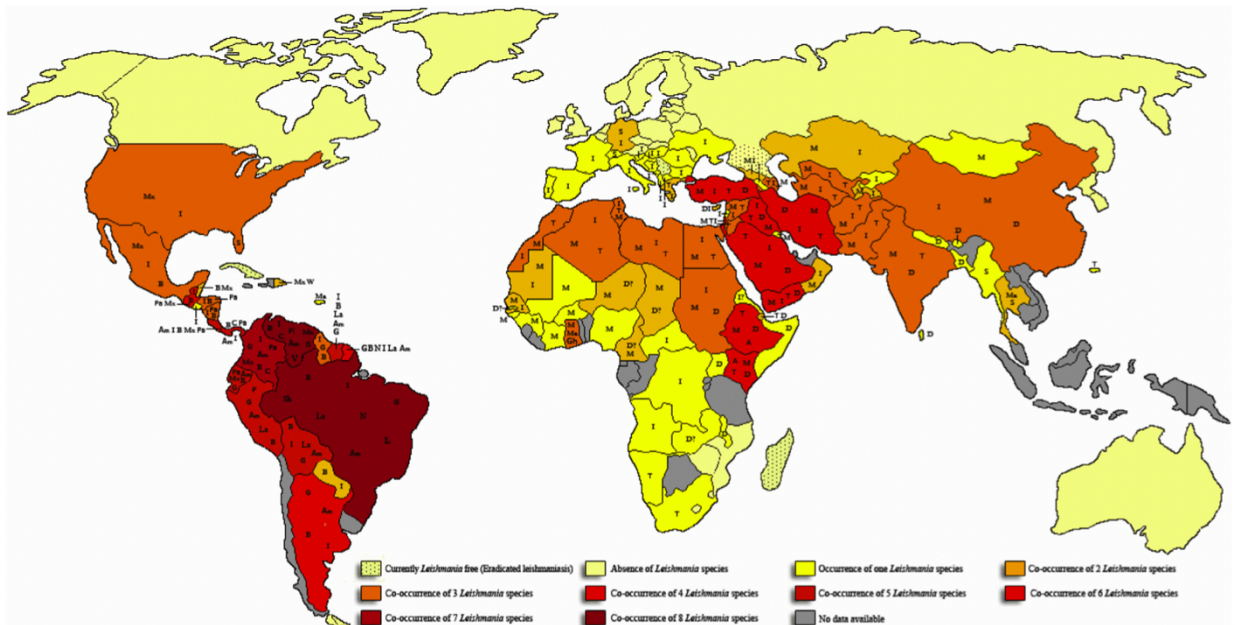
- Giống *Leishmania* (Ross, 1903).



Hình 1.12. a. *Leishmania* trong đại thực bào, b: *Leishmanias infantum* trong đại thực bào bị phá huỷ, nhuộm Giemsa vết bôi tủy 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 DNA), hoặc những triệu chứng lâm sàng và dịch tễ học khác nhau [28].

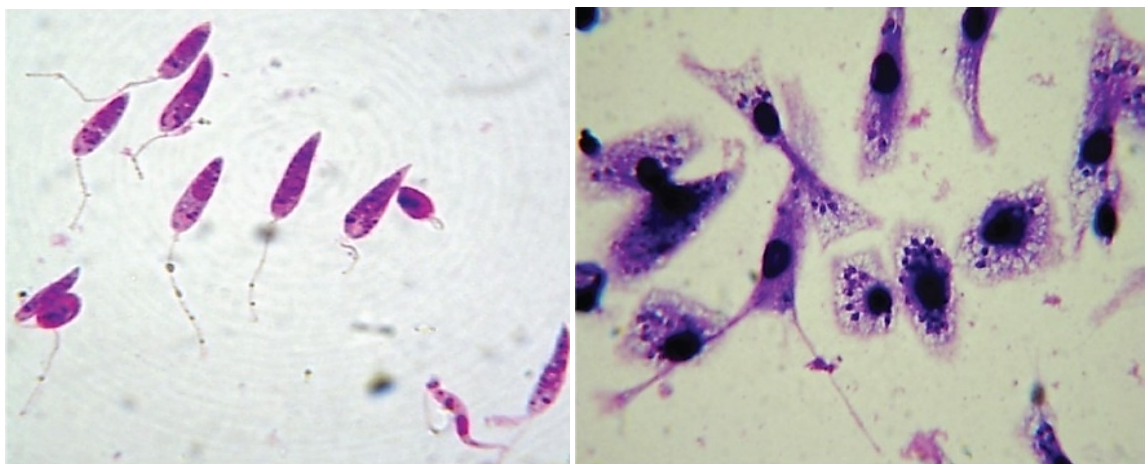


Hình 1.13. Bản đồ phân bố của 21 loài *Leishmania* gây bệnh cho người [28]

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*.

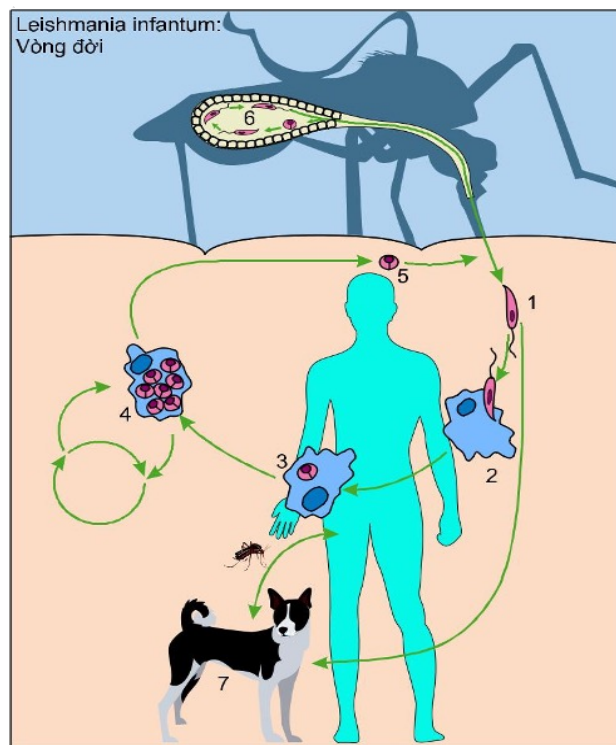
Ở người và động vật có xương khác, *Leishmania* ký sinh trong các thực bào đơn nhân (đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, tế bào Langerhans) dưới dạng amastigote. Nhuộm Giemsa có thể nhận ra chúng dưới kính hiển vi quang học, tế bào tròn đến hình bầu dục đường kính 2 - 5 μm với một nhân và kinetoplast hình 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 DNA kinetoplast (kDNA) [106].

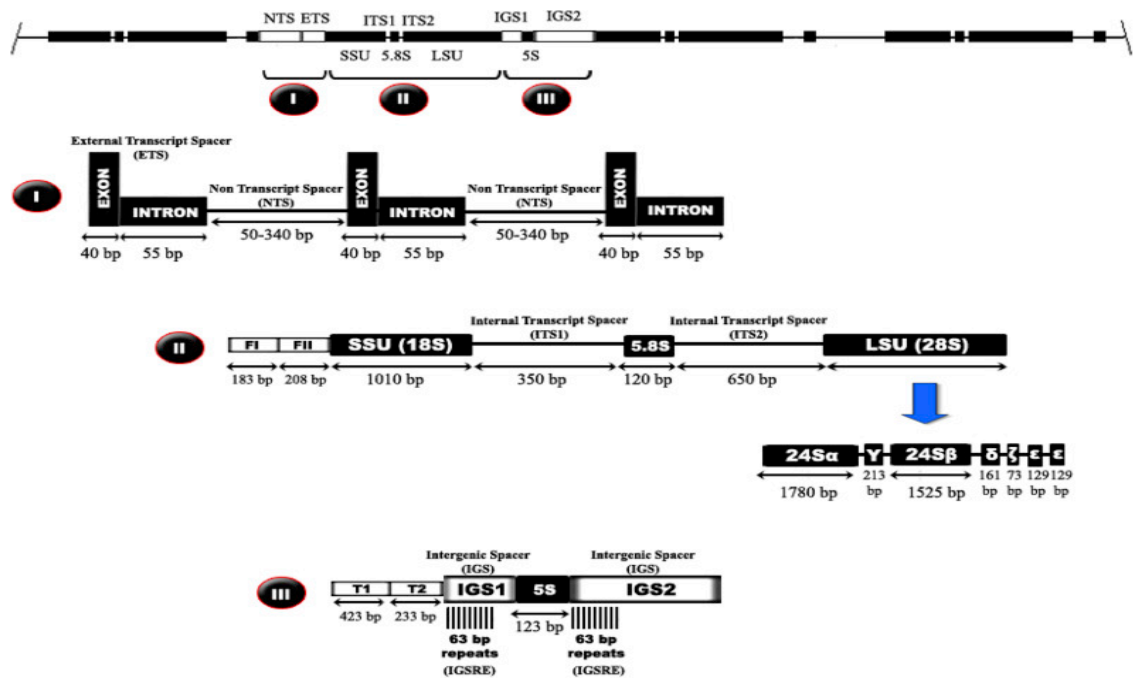
Các dấu hiệu di truyền được sử dụng để phát hiện *Leishmania* ở cấp độ giống

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. DNA nhiễm sắc thể

DNA ribosome (rDNA)

Các gen RNA 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 RNA polymerase I để tạo ra một phiên mã chính lớn (45S hoặc tiền rRNA) [176]. Gen 5S rRNA được phiên mã riêng rẽ bởi RNA 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 RNA của ribosome

Các 18S rRNA là một RNA 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 (24Sα và 24Sβ) 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 DNA 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 *Sauropsida* *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 RNA 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.

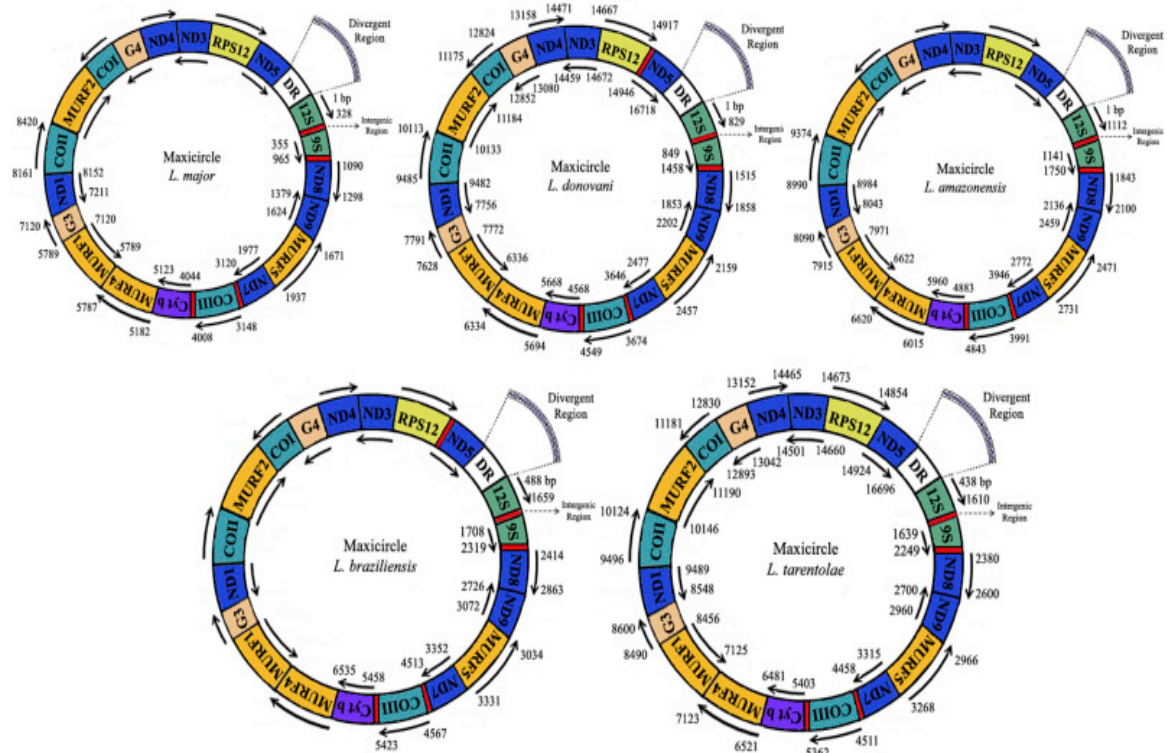
1.3.3.3. DNA ngoài nhiễm sắc thể

DNA Kinetoplast (DNA ty thể)

Tất cả các trùng roi kinetoplastid đều sở hữu một bộ gen ty thể duy nhất được gọi là DNA động bào (kDNA), bao gồm vài nghìn phân tử DNA 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 DNA ty thể của các sinh vật nhân thực khác. Minicircles chiếm khoảng 95% kDNA và mã hóa các phân tử RNA nhỏ được gọi là RNA dẫn đường, cung cấp thông tin cho việc biên tập RNA 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

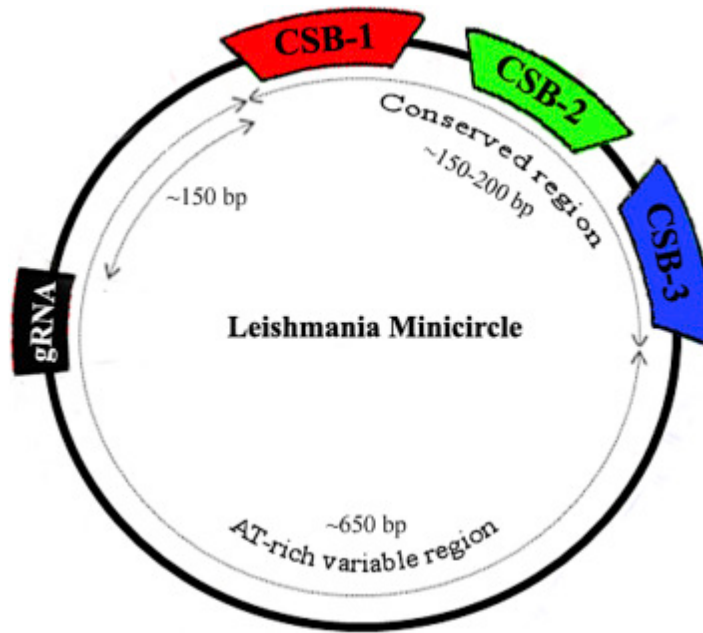
Thành phần kDNA mã hóa các tiểu đơn vị của phức hợp chuỗi hô hấp ty thể, một tiểu đơn vị ribosom và hai rRNA nhỏ bất thường (12S và 9S). Ngược lại với hầu hết các DNA ty thể, kDNA không mã hóa tRNA [32, 107]. Vòng tròn bao gồm vùng bảo tồn mã hóa protein và rRNA và vùng biến đổi không phiên mã (VR). 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 1.17. kDNA maxicircle, các gen thành phần và độ dài đoạn ở 5 loài *Leishmania*: *L. major*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* và *L. tarentolae* [28].

kDNA minicircle

Các minicircles kDNA có kích thước đặc trưng cho từng loài khác nhau, từ khoảng 0,8 đến 1,0 Kb. Vì những vòng tròn DNA nhỏ này có hàng nghìn bản sao trên mỗi tế bào, chúng là mục tiêu lý tưởng để phát hiện *Leishmania* có độ nhạy cao từ các mẫu sinh học có số lượng ký sinh trùng thấp [49]. Minicircles chiếm > 95% tổng khối lượng kDNA và các trình tự thường không đồng nhất của chúng (có khoảng 10 lớp trình tự khác nhau và số lượng minicircles trong mỗi lớp là thay đổi) có thể mất tính đa dạng trong quá trình nuôi cấy liên tục [39, 106]. Mỗi minicircle bao gồm một đến bốn vùng bảo tồn 150 - 200 bp chứa nguồn gốc của sự sao chép cho cả hai sợi, và một vùng biến đổi mã hóa thường là một gen gRNA đơn lẻ [166, 168].



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 do Leishmania 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 DNA:
 - + 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 DNA:
 - + 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 DNA | 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 DNA | 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] |
| | ELISA | Có | Ko | + | | | | | Ko | - | XX | XX | X | Sundar and Rai 2002[172], |
| Phương pháp huyết thanh học (Serological methods) | 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 | Gonçalves et al., 2002[70] |
| | MLEE | Ko | Có | + | + | + | + | + | Ko | + | | | X | Rioux et al., 1990[143] |
| Phương pháp dựa trên Protein | 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 (chí).

[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 DNA 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 do Leishmania bằng cách sử dụng các SL RNA [72, 82] và kDNA minicircles [56].

Real-time PCR cho phép định lượng hoặc bán định lượng các sản phẩm DNA được tạo ra bằng cách theo dõi sự khuếch đại của phân tử DNA mục tiêu trong mỗi chu kỳ PCR. Phương pháp này rất quan trọng đối với một số phương pháp điều trị bệnh Do Leishmania [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 DNA 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 DNA trong quá trình phân ly DNA sợi kép (dsDNA) thành DNA 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 DNA 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. Bệnh do *Leishmania* và một số đặc điểm dịch tễ

1.3.5.1. Dịch tễ học bệnh do *Leishmania* trên thế giới

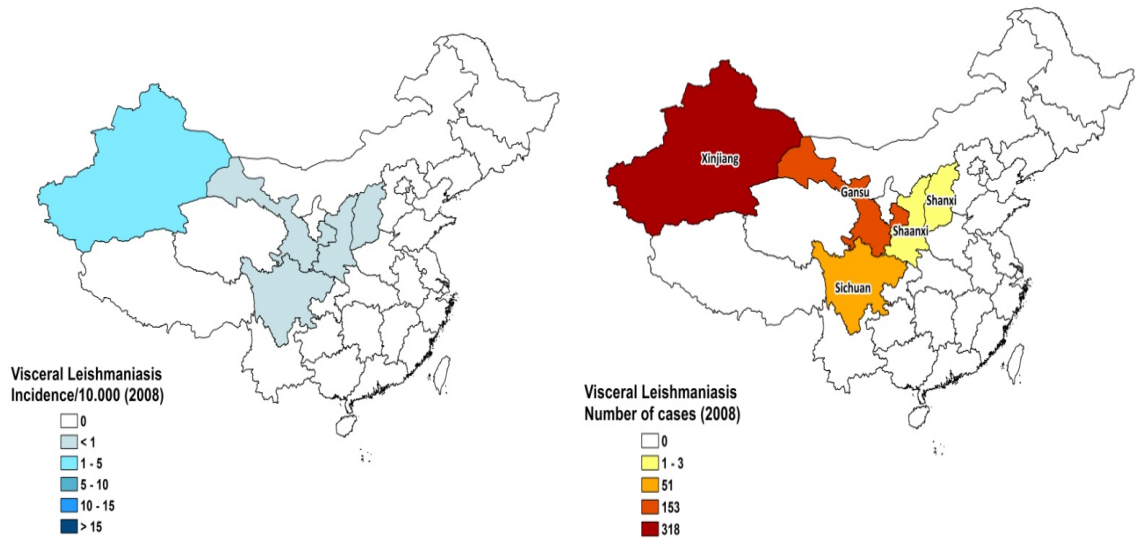
Bệnh do *Leishmania* vẫn là một trong những căn bệnh bị lãng quên trên thế giới trước khi TCYTTG nhấn mạnh việc cần phải kiểm soát bệnh này. Bệnh ảnh hưởng đến phần lớn những người nghèo ở các nước đang phát triển; 350 triệu người được coi là có nguy cơ nhiễm bệnh do *Leishmania*, và khoảng 2 triệu trường 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 do *Leishmania* 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 do *Leishmania* 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 do Leishmania 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 do Leishmania vào tháng 3/2010, sau đó đã ban hành báo cáo kỹ thuật cập nhật đầu tiên về bệnh do Leishmania trong hơn 20 năm [182].

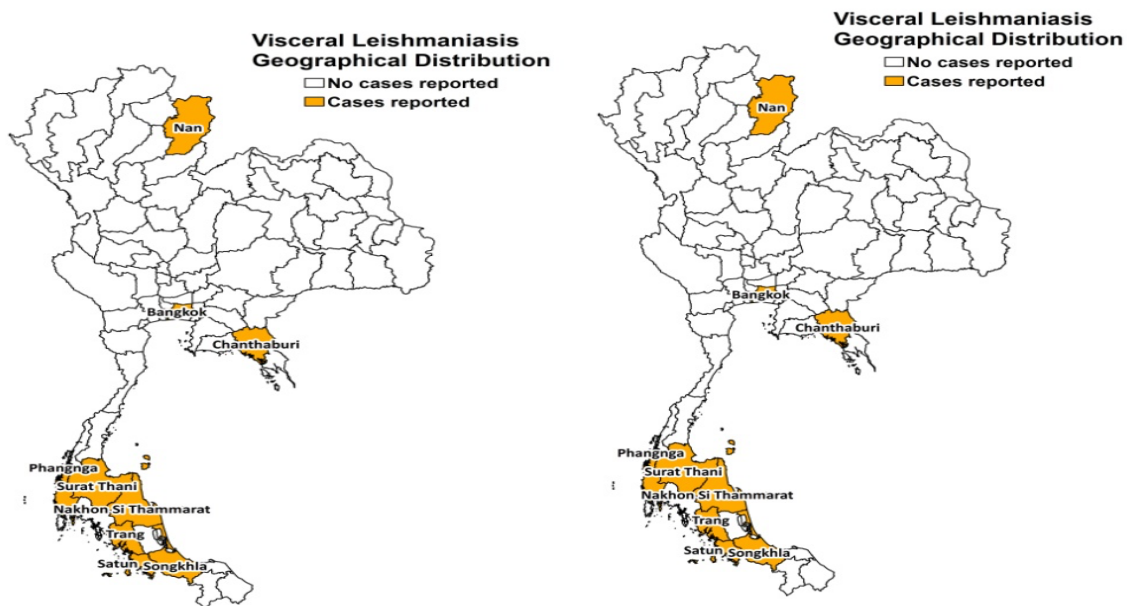
Tỷ lệ mắc kala-azar (thể bệnh VL) trên toàn cầu hàng năm được báo cáo là 58.200 người trong đó 42.619 người xuất phát từ các nước trong lục địa Ấn Độ. Tuy nhiên, số lượng người mắc thực tế có thể cao hơn rất nhiều và số ca mắc kala-azar hàng năm được ước tính trên toàn cầu và Ấn Độ lần lượt là 201.500 – 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/10.0000 dân. [34] (Hình 1.19).



Hình 1.19. Bệnh do Leishmania 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.

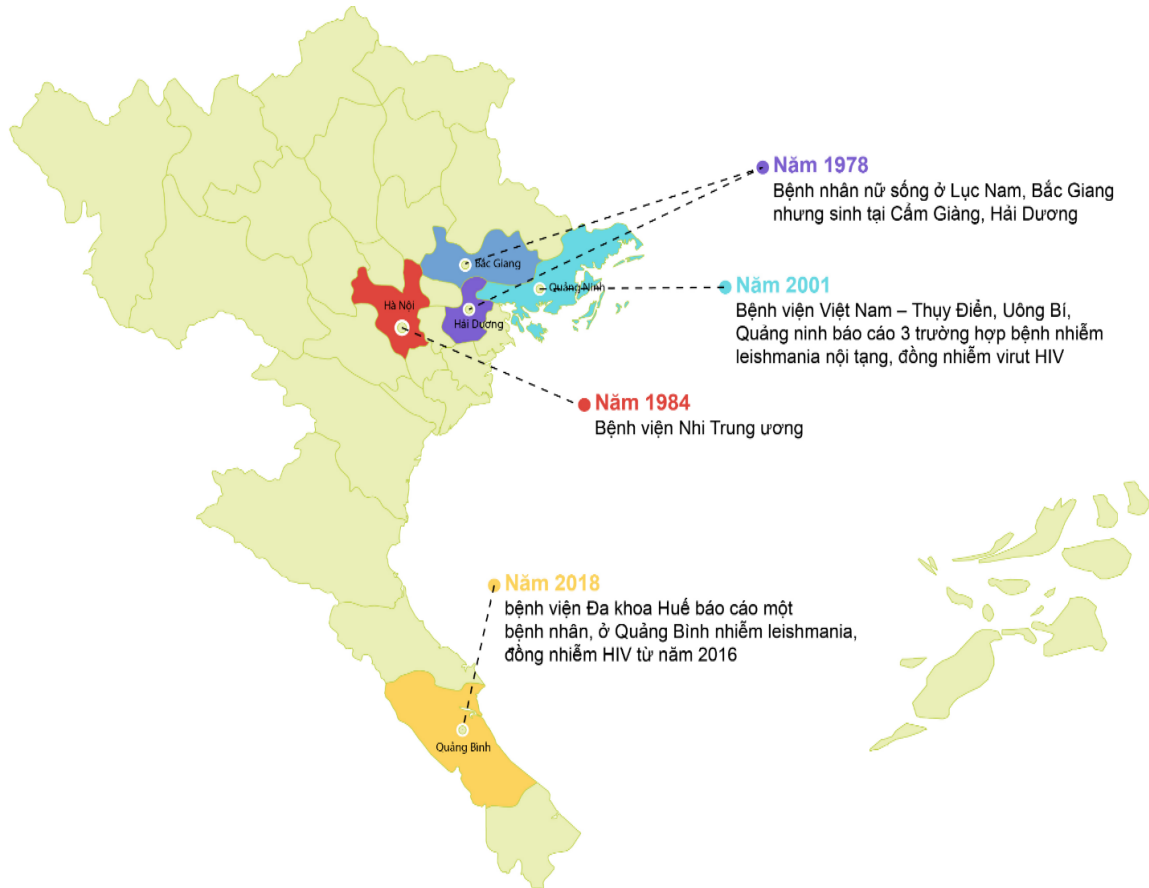


Hình 1.20. Bệnh do Leishmania được tổng hợp tại Thái Lan 2004-2010 [34]

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 do *Leishmania* 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. Bệnh do *Leishmania* 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 do *Leishmania* ở da (CL-cutaneous *Leishmaniasis*)

Bệnh do *Leishmania* cư trú ở da (CL), 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 do *Leishmania* 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 do *Leishmania* nội tạng (VL- visceral *Leishmaniasis*)

Bệnh do *Leishmania* 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 chứng chính sốt, sung lách, tăng Ig gamma máu, thiếu máu cấp tính, giảm bạch cầu.

Bệnh do *Leishmania* 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 độ 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 do *Leishmania* ở da và niêm mạc (MCL: mucocutaneous *Leishmaniasis*)

Bệnh do *Leishmania* ở da và niêm mạc ít phổ biến. Đây có thể là một di chứng của bệnh do *Leishmania*: 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 bệnh do *Leishmania* 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 do *Leishmania* cư trú ở 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 tấm chất diệt côn trùng. Kiểm soát vector 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 tyn 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 muối 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:

Muối 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, muối được đổ ra khay và dùng chổi cọ quét sạch muối dính trên túi net. Muối cát được sàng lọc dưới kính lúp hai thị kính ở độ phóng đại 60 lần.

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

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

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

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

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

Lưu mẫu: Muối đực: cất giữ tube 1,5ml chứa còn 70%.

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

Khi kết thúc toàn bộ chuyển 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 gấn 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 phần 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 DNA/RNA:

- + 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 | cFD2 | GTGTCCCAGCCGGCGGTGTCATCAGC | 50 μ M |
| | forward | | |
| <i>Flavivirus</i> | MAMD | AACATGATGGGRAARAGRGARAA | 50 μ M |
| | reverse | | |

-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°C, -20°C, và -80°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 ẩm 33°C, 37°C | Sanyo |
| Kính hiển vi lộn ngược | Olympus |

- Vật tư tiêu hao:

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

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

+ 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 DNA/RNA**

- 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 µl 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 RNA, sẽ được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR. Lượng hỗn dịch sinh phẩm và mẫu RNA 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 | RNA 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 μl sản phẩm PCR với 2 μl ExoSAP. Tổng thể tích phản ứng là 7 μl . 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 μl |
| Nước không ion | 5 μl |
| Môi*(3,2 μM) | 0,2 μl |
| 5x Sequencing Buffer | 1 μl |
| DNA khuôn | 2 μl |
| Tổng số | 15μl |

* 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
- Nhỏ 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 DNA 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 DNA/RNA: tương tự mục 2.2.5
- Sinh phẩm Nested PCR:
 - + GoTaq (Cat No M7123, Promega)
 - + Cặp mồi cho phản ứng Nested-PCR [123]

| Mỗi 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 | TCGCAGAACGCCCCT | 10 μ M |
| | 13Z | kDNA | TCGCAGAACGCCCCT | 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.

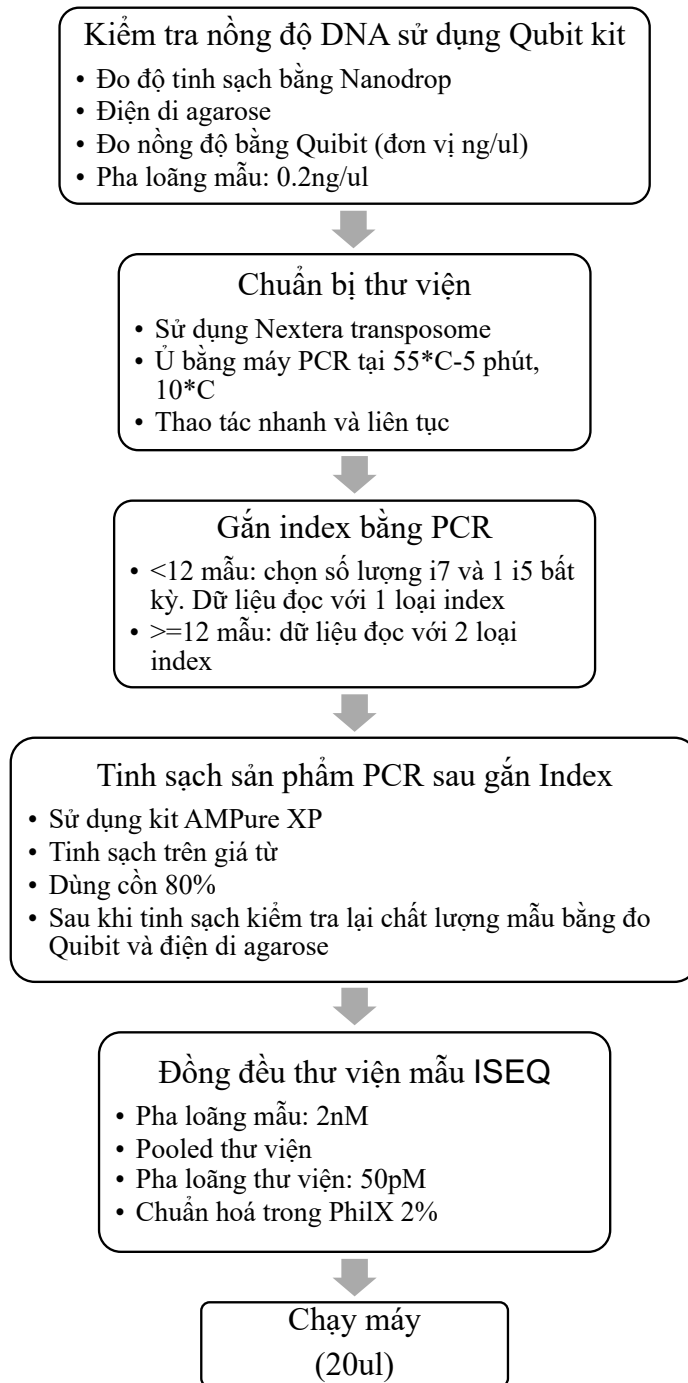
- Mẫu dương tính với nhóm Leishmania: các sản phẩm PCR có kích thước trên 500 bp. Kích thước band tương ứng: *L. amazonensis* MHOM/BR/73/LV78 (517bp); *L. major* MHOM/ET/95/FV1 (560-570 bp); *L. infantum* (680 bp); *L. tropica* (750 bp) [123].

- 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 thư

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 DNA sử dụng Qubit kit

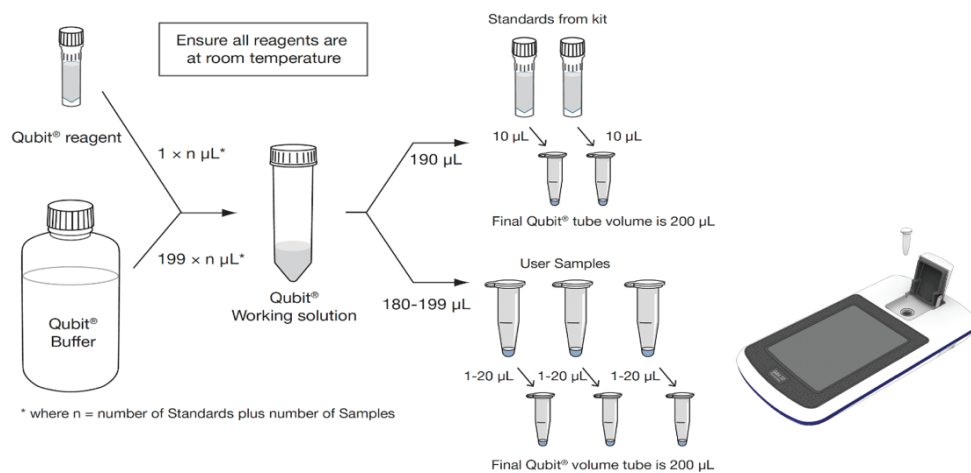
- Chuẩn bị 2 tube cho 2 loại Standard (Qubit dsDNAHS1, HS2), mỗi mẫu cần đo chuẩn bị 1 tube.

- 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/ μ l 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 |

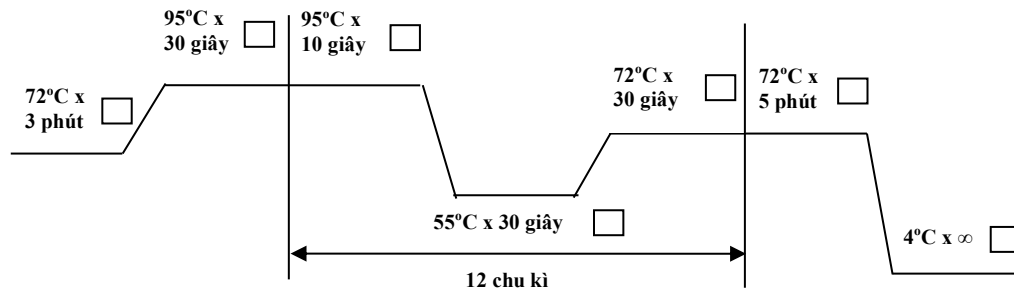
| | | | |
|------|----|--------------------------|---|
| DNA | 5 | | 10 °C/ ∞ |
| ATM | 5 | Trộn 10 lần Spin down | Ngay khi nhiệt độ giảm đến 10 °C cho NT |
| NT | 5 | | Nhiệt độ phòng 5 phút |
| Tổng | 25 | | |

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
 - 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)
 - 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

○ Bỏ 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 DNA)

- Đặt mẫu vào khay, bỏ 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 DNA 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 đã 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 thể 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 muỗi cát: *Sergentomyia* (n=2067, 79,96%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *Phlebotomus* (n=340; 13,15%), *Chinus* (n=31, 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14, 0,54%) và *Grassomyia* (n=6; 0,23%).

Tổng số 13 loài đã được định danh, trong đó *Sergentomyia* có 7 loài [*Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *brevicaulis* group, *Segentomyia* (*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>Segentomyia (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 (Larroussius) 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 (Larroussius) 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*

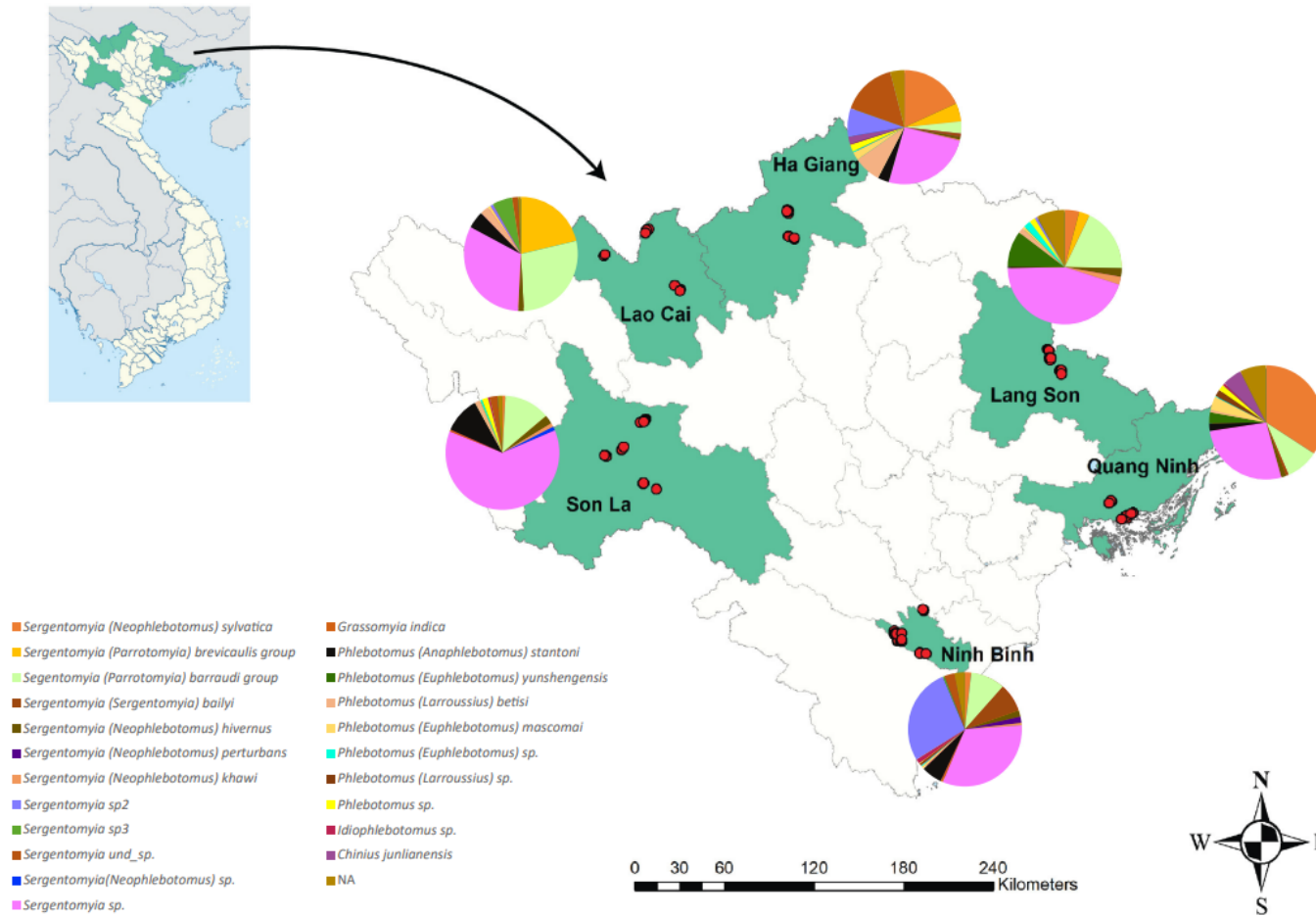
Các giống khác bao gồm 37 mẫu vật, chỉ được đại diện bởi một loài mỗi giống, *Ch. junlianensis* và *Gr. indica* (Bảng 3.1). 14 mẫu vật thuộc *Idiophlebotomus* không thể được xác nhận một cách chắc chắn về cấp loài và được đặt tên là *Idiophlebotomus sp.*

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) 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) | 16,09 | 23,68 | 28,16 | 4,72 | 13,42 | 13,9 |
| Mật độ (D) | 1,53 | 1,80 | 2,39 | 0,41 | 2,18 | 3 |
| Số loài (SR)* | 9 | 12 | 11 | 8 | 11 | 1,25 |

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 $RA_{Sơn\ La}=13,93$; 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) hibernus</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 (Larroussius) 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 (Larroussius) 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.

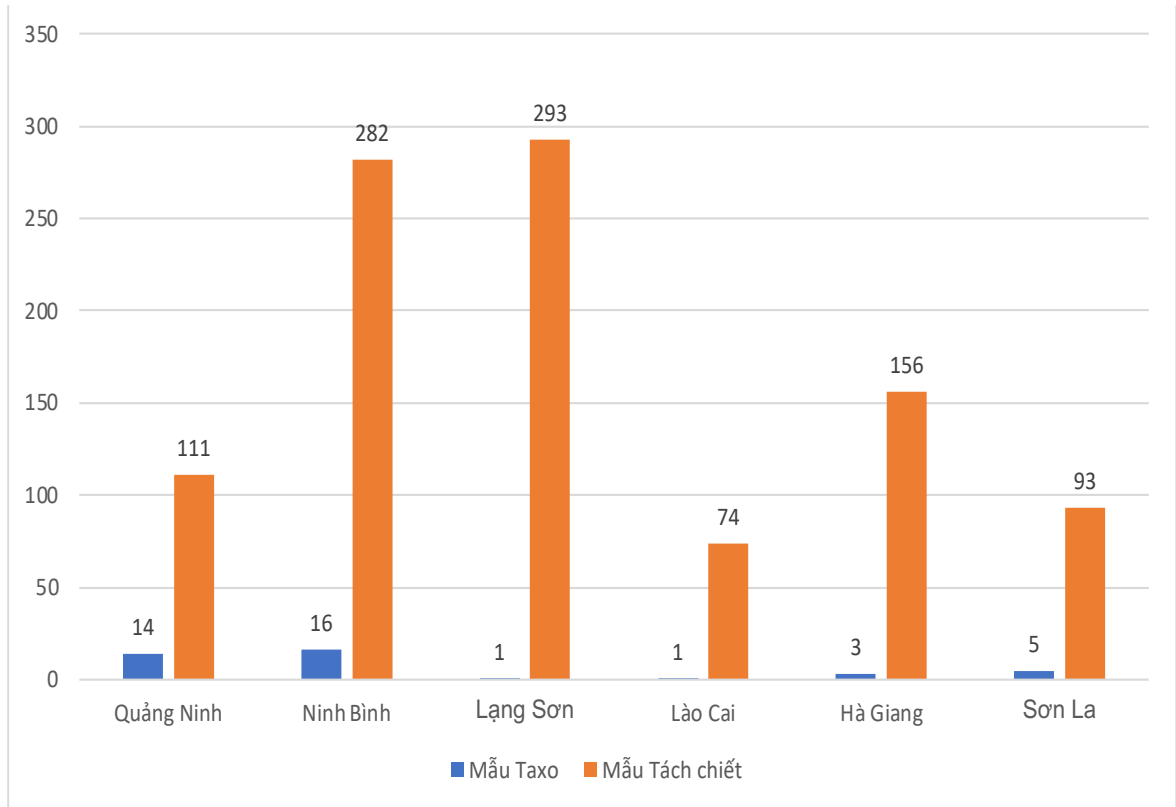
Trong các hang động số lượng loài là nhiều nhất, tất cả các giống và loài đã được tìm thấy (Bảng 3.3 và hình 3.1). Tuy nhiên, giống *Sergentomyia* là đại diện nhất, tiếp theo là giống *Phlebotomus*. Trong chuồng chó và trong nhà, loài muỗi cát được thu thập nhiều nhất là *Ph. stantoni* ($n_{\text{chuồng chó}} = 7$ 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 DNA/RNA 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 DNA/RNA 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.

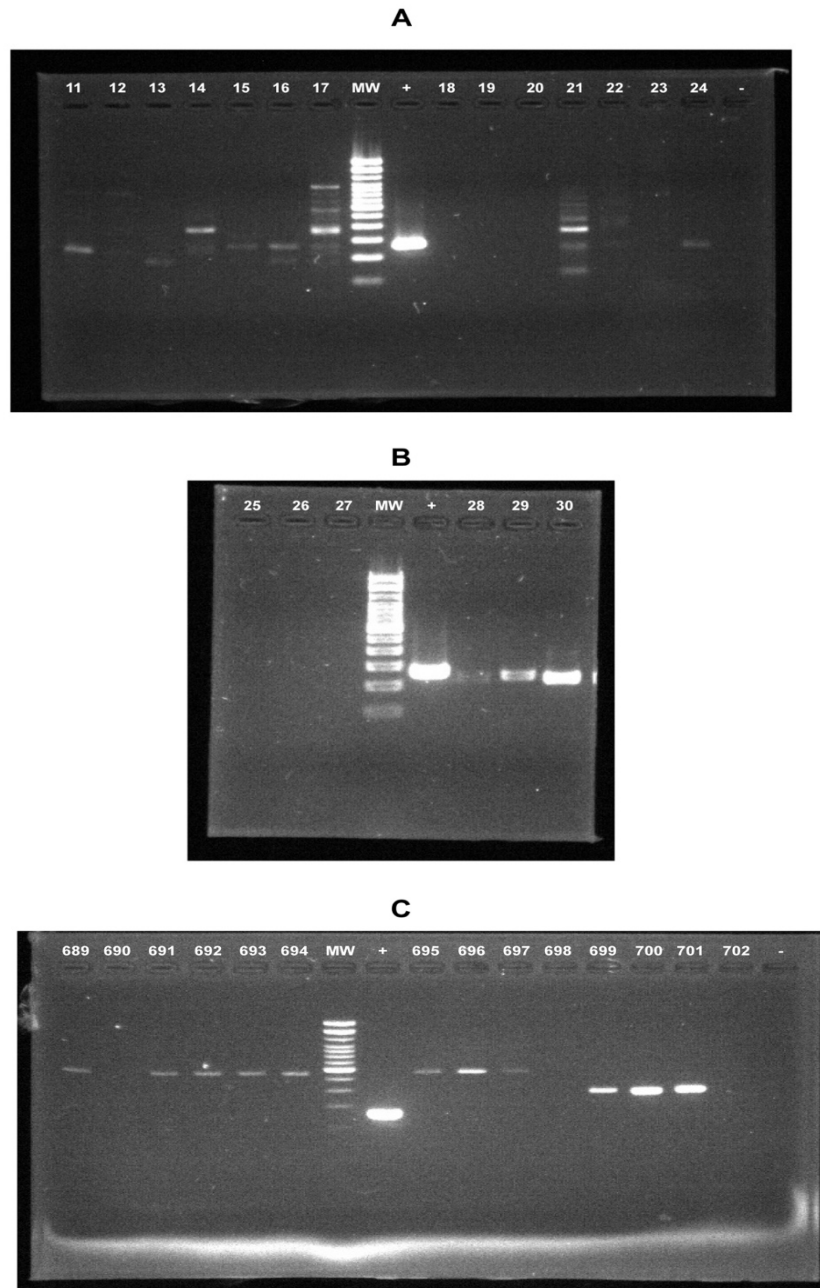


Hình 3.2. Sự phân bố muỗi cát cái tại 6 tỉnh nghiên cứu, 2016

3.2. THỰC TRẠNG NHIỄM FLAVIVIRUS Ở MUỖI CÁI TẠI ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

3.2.1 Sàng lọc Flavivirus trên muỗi cát cái

Nghiên cứu sử dụng cặp mồi cFD2/MAMD trên gen NS5 để xác định vi rút thuộc nhóm Flavivirus trên muỗi 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

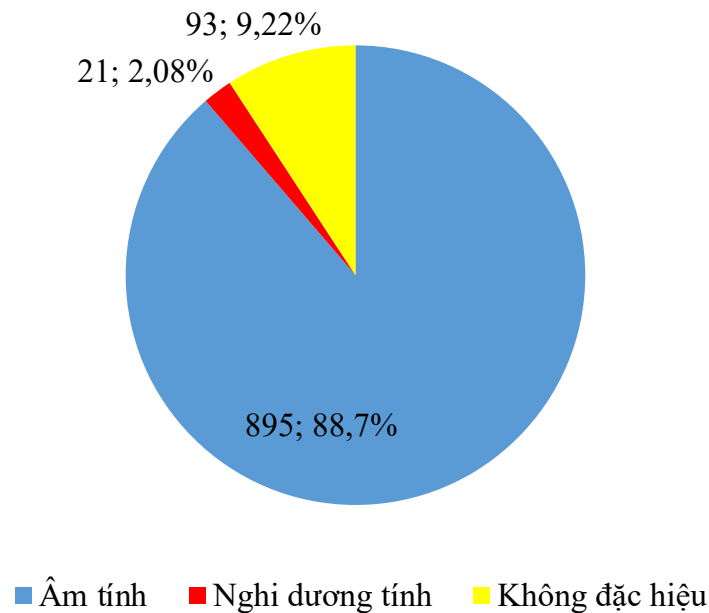
(+): Mẫu chứng dương, (-): Mẫu chứng âm, (MW): Thang trọng lượng phân tử 100bp

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 muối cá cái

Kết quả sàng lọc Flavivirus trên muối cá cho thấy có 21/1009 mẫu được nghi ngờ là dương tính với Flavivirus hay RNA Flavivirus có liên quan đến muối cá (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 muối cá 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).

| Flavivirus Genotyping Tool Version 0.0 | | | | | |
|---|--------------------------|--------------------------------------|--------------|-----------------|-------------------|
| Submit Job | Monitor job [2059842368] | How to cite | Introduction | How to use | Example sequences |
| Flavivirus Genotyping Tool Results | | | | | |
| You may bookmark this page to revisit results of this job (2059842368) later. | | | | | |
| Download results: XML File Table (Excel format) Table (CSV format) Sequences (Fasta format) | | | | | |
| 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 |

Developed by: [RIVM](#) (Harry Vennema, Annelies Kroneman) and [Emweb bvba](#).

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 RNA 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 RNA 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 RNA của DEN2 đầu tiên (M2.25.56) được thu thập ngày 28/06/2016 tại tổ Bái Ca, xã Cúc Phương, huyện Nho Quan, 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.

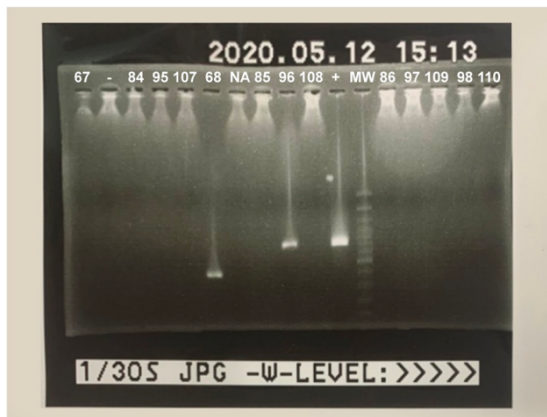
Mẫu muỗi cát cái mang RNA của DEN2 thứ 2 (M3.53.07) được thu thập ngày 03/8/2016 tại thôn Khom Khong, xã Hồng Phong, huyện Cao Lộc, tỉnh Lạng Sơn (vĩ độ: 21°56.069', kinh độ: 106°41.061'). Mẫu được sàng lọc trên muỗi cát cái *Sergentomyia barradi* thu thập ở sinh cảnh trong hang.

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

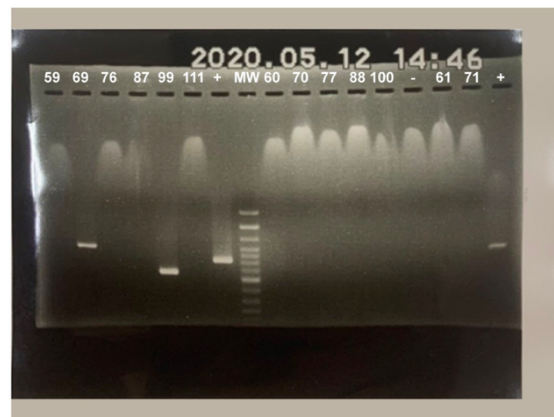
3.3.1. Sàng lọc Leishmania bằng phương pháp Nested-PCR

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

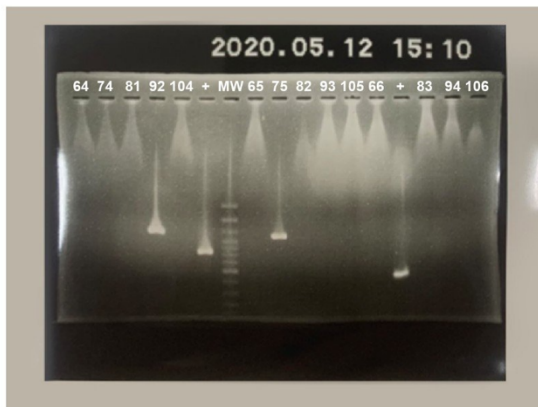
L1



L2

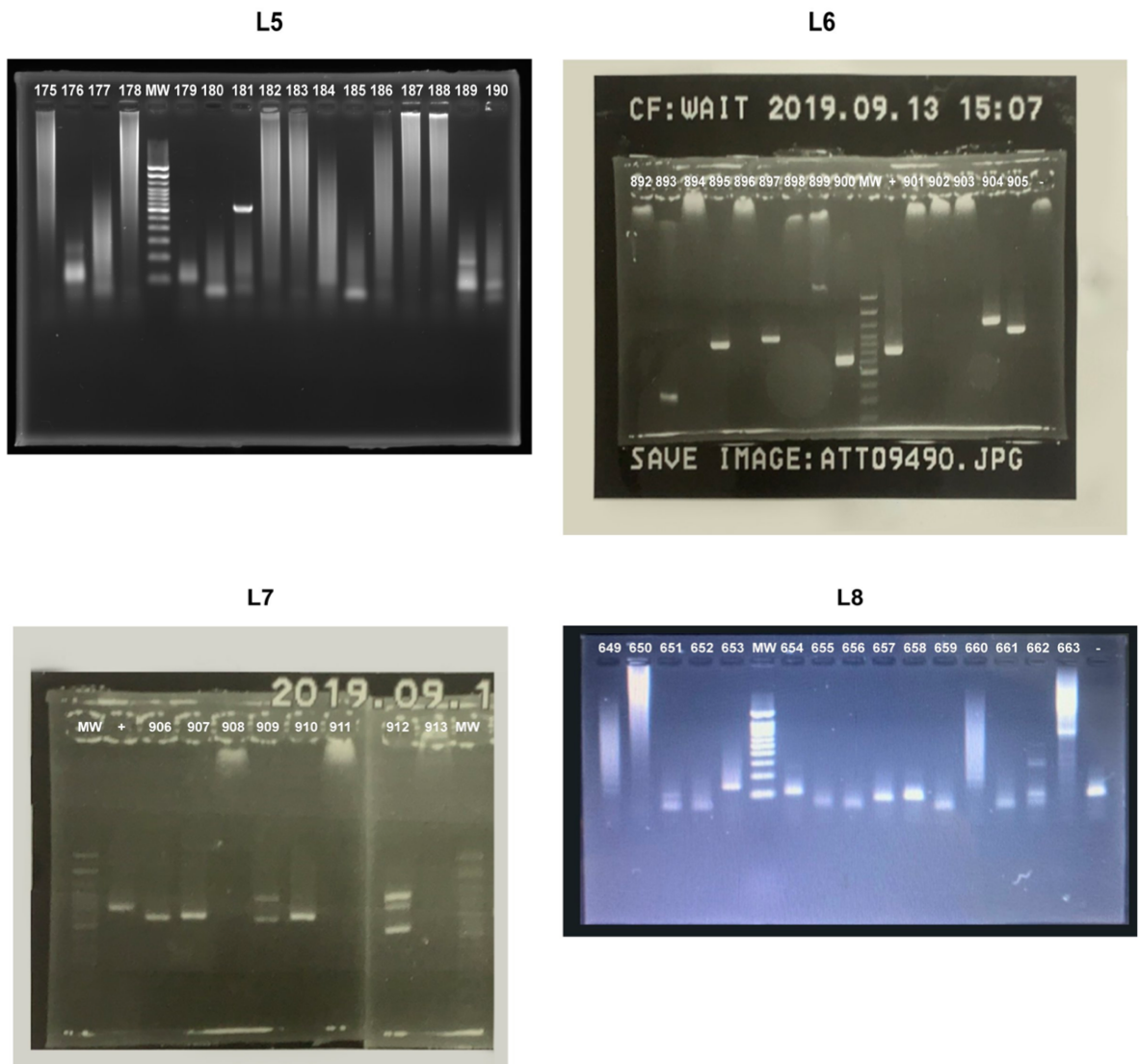


L3



L4





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

(+): Mẫu chứng dương; (-): Mẫu chứng âm; (MW): Thang trọng lượng phân tử 100bp
 Các giếng được đánh số tương ứng với mẫu muối 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 3.6-L1) Mẫu 895 (Hình 3.6-L6) | 300 |
| 2 | 06 | Mẫu 79 (hình 3.6-L4) Mẫu 99 (hình 3.6-L2) Mẫu 906, 907, 909, 910 (hình 3.6-L7) | 500 |
| 3 | 05 | Mẫu 96 (hình 3.6-L1) Mẫu 181(hình 3.6-L5) Mẫu 900, 897 (hình 3.6-L6) và 912 (hình 3.6-L7) | 600-750 |
| 4 | 07 | Mẫu 69 (hình 3.6-L2), Mẫu 75, 92 (hình 3.6-L3) Mẫu 904, 905, 899 (hình 3.6- L6) và 663 (hình 3.6– 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

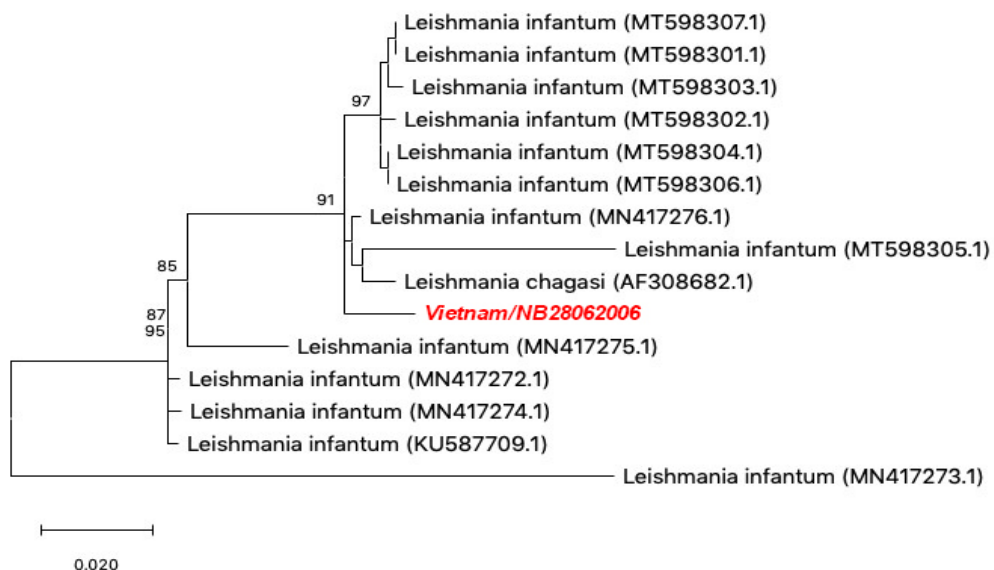
| STT mẫu | Số trình tự có sự tương đồng với <i>Leishmania</i> | Số trình tự chưa xác định | Số trình tự không có thông tin | Tổng số trình tự |
|----------------|--|---------------------------|--------------------------------|------------------|
| 1 | | 3 | | 3 |
| 2 | 2 | 1 | 1 | 4 |
| 3 | | | 3 | 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 NCBII, 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%) |

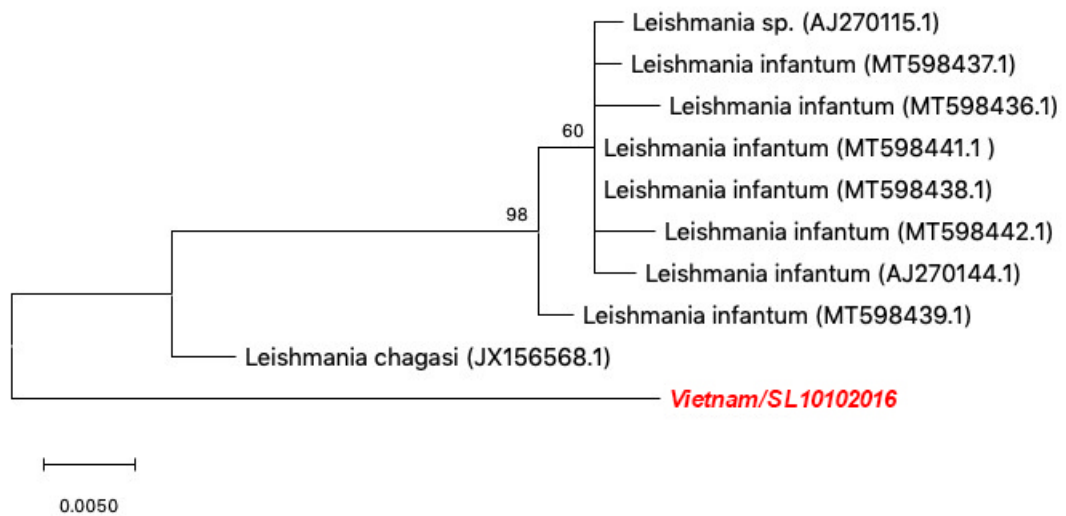
Trong 20 mẫu dương tính với Nested PCR, sau khi phân tích các trình tự thu được đã xác định được 3 mẫu có trình tự tương đồng với *Leishmania*: Mẫu số 2 (*Vietnam/NB28062006*): tương ứng với mẫu 69 (Hình 3.7A-L2): >800bp; mẫu số 20 (*Vietnam/SL10102016*): tương ứng với mẫu 79 (Hình 3.7A-L4): 500 bp và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



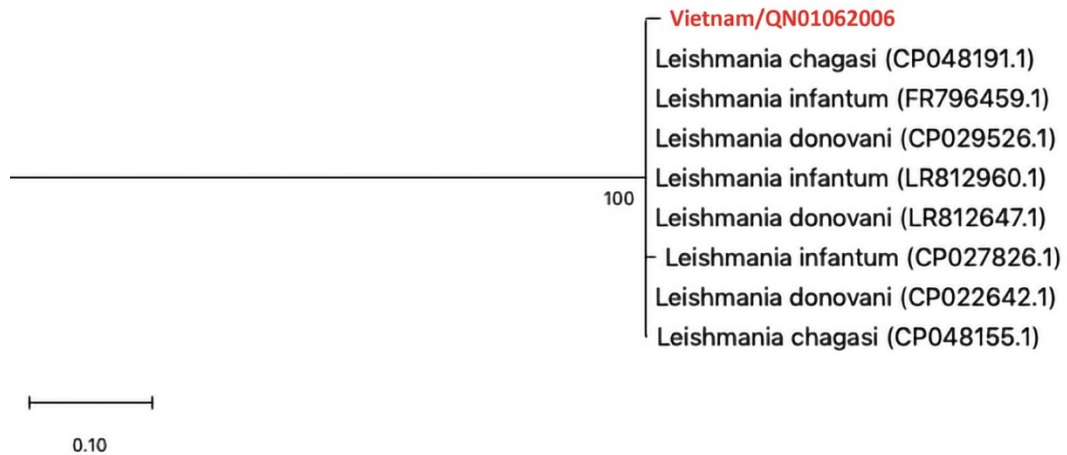
Hình 3.8. Cây chủng loại phát sinh trên gen kDNA minicircle của mẫu thu thập tại Sơn La (Vietnam/SL210102016).

**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 *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 | CCAGCGGGAGCGCCCGTCAGAGTCGCTGCAACGTGTTGGCGGAACCGCGCTCTTTGGTTG | 60 |
| Sbjct | 251340 | CCAGCGGGAGCGCCCGTCAGAGTCGCTGCAACGTGTTGGCGGAACCGCGCTCTTTGGTTG | 251399 |
| Sample4 | 61 | AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGGACCGAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC | 120 |
| Sbjct | 251400 | AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGGACCGAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC | 251459 |
| Sample4 | 121 | GACAAGTGCGAGAGCATCAGCGCCGCCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGCGGAATGATGTA | 180 |
| Sbjct | 251460 | GACAAGTGCGAGAGCATCAGCGCCGCCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGCGGAATGATGTA | 251519 |
| Sample4 | 181 | GGCTCGCACCGGAGCCGGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG | 240 |
| Sbjct | 251520 | GGCTCGCACCGGAGCCGGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG | 251579 |
| Sample4 | 241 | TGCAGCACGTTCCGCCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGGAACAGTGTGTTGTGGCGCCTGTCTC | 300 |
| Sbjct | 251580 | TGCAGCACGTTCCGCCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGGAACAGTGTGTTGTGGCGCCTGTCTC | 251639 |
| Sample4 | 301 | TGCACGCGGGTCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG | 360 |
| Sbjct | 251640 | TGCACGCGGGTCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG | 251699 |
| Sample4 | 361 | TGGTAGTGATACgagagagagagagCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG | 420 |
| Sbjct | 251700 | TGGTAGTGATACGAGAGAGAGAGAGCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG | 251759 |
| Sample4 | 421 | TATGCGGTCCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG | 480 |
| Sbjct | 251760 | TATGCGGTCCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG | 251819 |
| Sample4 | 481 | TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG | 540 |
| Sbjct | 251820 | TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG | 251879 |
| Sample4 | 541 | TCACGCACCAGGGTGCGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC | 600 |
| Sbjct | 251880 | TCACGCACCAGGGTGCGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC | 251939 |
| Sample4 | 601 | GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCAGCATGTTGGCGAGGTGCTTCTGGATAA | 660 |
| Sbjct | 251940 | GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCAGCATGTTGGCGAGGTGCTTCTGGATAA | 251999 |
| Sample4 | 661 | TGCGGAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCTCTCTTCTCCTCGCGCGCTCG | 720 |
| Sbjct | 252000 | TGCGGAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCTCTCTTCTCCTCGCGCGCTCG | 252059 |
| Sample4 | 721 | GGCACGGTTGGCATAAACGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT | 780 |
| Sbjct | 252060 | GGCACGGTTGGCATAAACGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT | 252119 |
| Sample4 | 781 | TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCTCCGCGCG | 840 |
| Sbjct | 252120 | TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCTCCGCGCG | 252179 |
| Sample4 | 841 | CTCTGGCTTCTCCCATACACGCGTGTGGTACTGGTGCAGGAGCTTGCCAAATCGCAACAA | 900 |
| Sbjct | 252180 | CTCTGGCTTCTCCCATACACGCGTGTGGTACTGGTGCAGGAGCTTGCCAAATCGCAACAA | 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      AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGGACCGAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC 120
          |||
Sbjct  268102  AGCAAATCATGCATAGCACTCCAGAGGACCGAGCGCGTCTTGGGCGTGAGCTGCTGCTGC 268161
          |||

Sample4 121     GACAAGTGCGAGAGCATCAGCGCCGCCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGGCGAATGATGTA 180
          |||
Sbjct  268162  GACAAGTGCGAGAGCATCAGCGCCCGTCCGGTGCCGTCGACTAGAGTGGCGAATGATGTA 268221
          |||

Sample4 181     GGCTCGCACCGGAGCCGGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG 240
          |||
Sbjct  268222  GGCTCGCACCGGAGCCGGAGGGAGCGAGAGGGCGGATGGAAGGCCGTGCAGCGCTGCTTG 268281
          |||

Sample4 241     TGCAGCACGTTTCGCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGAACAGTGTTTGTGGCGCCTGTCTC 300
          |||
Sbjct  268282  TGCAGCACGTTTCGCAAAAGGTAAGAAAAAAGTGAACAGTGTTTGTGGCGCCTGTCTC 268341
          |||

Sample4 301     TGCACGCGGGTTCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG 360
          |||
Sbjct  268342  TGCACGCGGGTTCGCGAGTCGACACACCGTGTCTCTTGGTTCTAGTTGAAAGGTGGATCGG 268401
          |||

Sample4 361     TGGTAGTGATACgagagagagagagCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG 420
          |||
Sbjct  268402  TGGTAGTGATACGAGAGAGAGAGAGCCACGTTAGATCGAGTGTGCGTATGTGTTGTGTG 268461
          |||

Sample4 421     TATGCGGTCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG 480
          |||
Sbjct  268462  TATGCGGTCTCTCTGTTTGCTCCGTGAACCGCCCGCTGCCTATTGGAGGCTGCAGAAG 268521
          |||

Sample4 481     TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG 540
          |||
Sbjct  268522  TACGAGATGCGAGCATCTCAAGATGGTGCAGATAAGAACAAAAGGAAAAAGGCAGCTGCG 268581
          |||

Sample4 541     TCACGCACCAAGGTCGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC 600
          |||
Sbjct  268582  TCACGCACCAAGGTCGCGCAGGCTTAGTTCAACGAAAGCACCAGCATAGACGCACTCGC 268641
          |||

Sample4 601     GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCACATGTTGGCGAGGTGCTTCCTGGATAA 660
          |||
Sbjct  268642  GTATGGGTCTCGGGGATGCTAAGCAAGCTGGCACATGTTGGCGAGGTGCTTCCTGGATAA 268701
          |||

Sample4 661     TCGGAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCCTCTCTTCTCCTGCGGCGCTCTG 720
          |||
Sbjct  268702  TCGGAAGAGGGTTTAGGCTCCAGAGATGCACTACCCTCTCTTCTCCTGCGGCGCTCTG 268761
          |||

Sample4 721     GGCACGGTTGGCATAAACGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT 780
          |||
Sbjct  268762  GGCACGGTTGGCATAAACGAGACGCAAGACAATCGATTACGTGGTATCGCACGTCCTCCT 268821
          |||

Sample4 781     TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCCTCCGCGCG 840
          |||
Sbjct  268822  TGCTCTGGCTCTCTGCATGAAGTCTCTCCTTCTGCTACTTTGACGTTCTCCTCCGCGCG 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

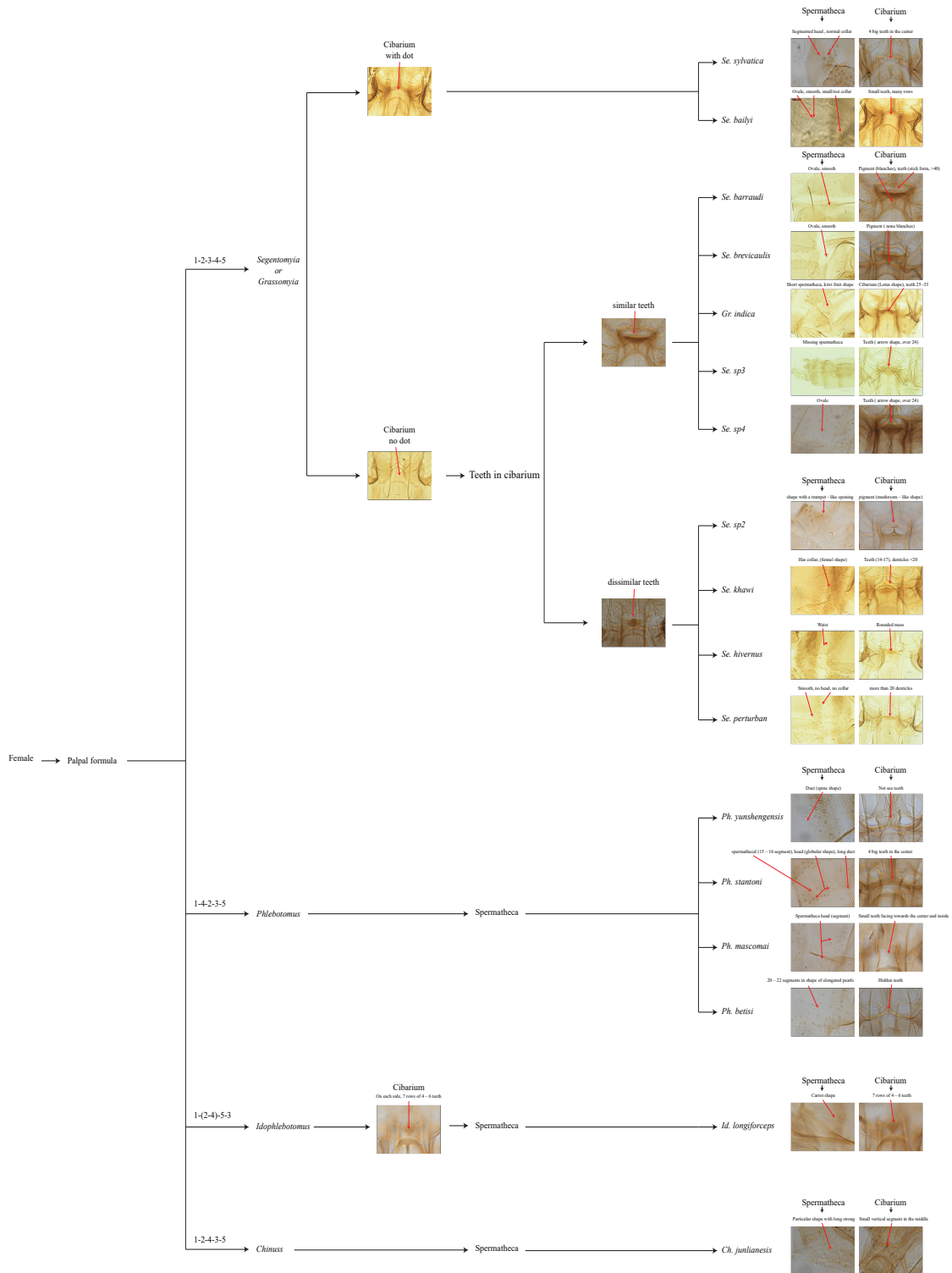
4.1. THÀNH PHẦN LOÀI VÀ MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC SINH CỦA MUỖI CÁT TẠI 6 TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM, 2016-2018

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.

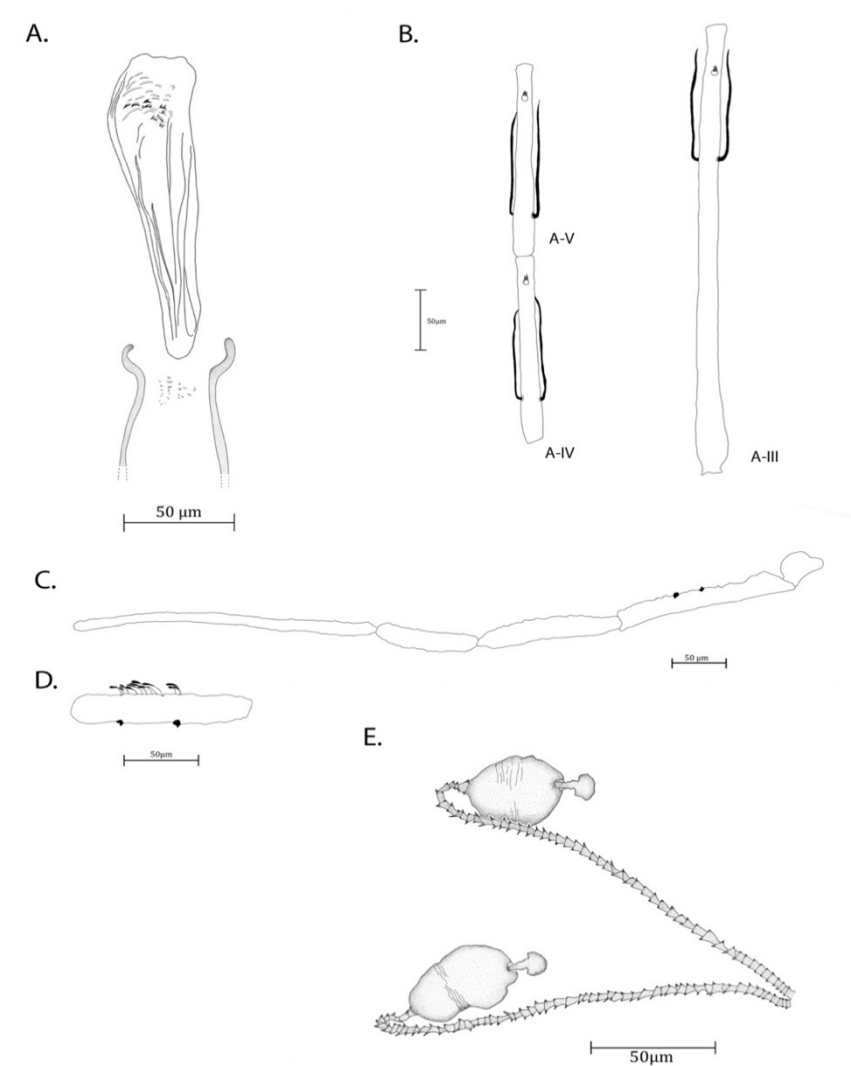
– *Ph. betisi* được xác định rất dễ dàng vì nó là loài duy nhất thuộc phân giống *Larroussius* được ghi nhận ở Đông Nam Á. Thêm vào đó, một số đặc điểm khác biệt để nhận dạng là cổ của túi chứa tinh hoặc vị trí của các gai trên gonostyle [86].

– *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:**

- Trẩm (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 chàm 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) $p_1 = 33 \mu\text{m}$, $p_2 = 164 \mu\text{m}$, $p_3 = 120 \mu\text{m}$, $p_4 = 97 \mu\text{m}$, $p_5 = 283 \mu\text{m}$. 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 p_3 ; 4 trên p_4 and 8 trên p_5 ;
- Labrum-Epipharynx (phần phụ miệng) dài 223. $fl/E = 1.65$;
- 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 $184 \mu\text{m}$ 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

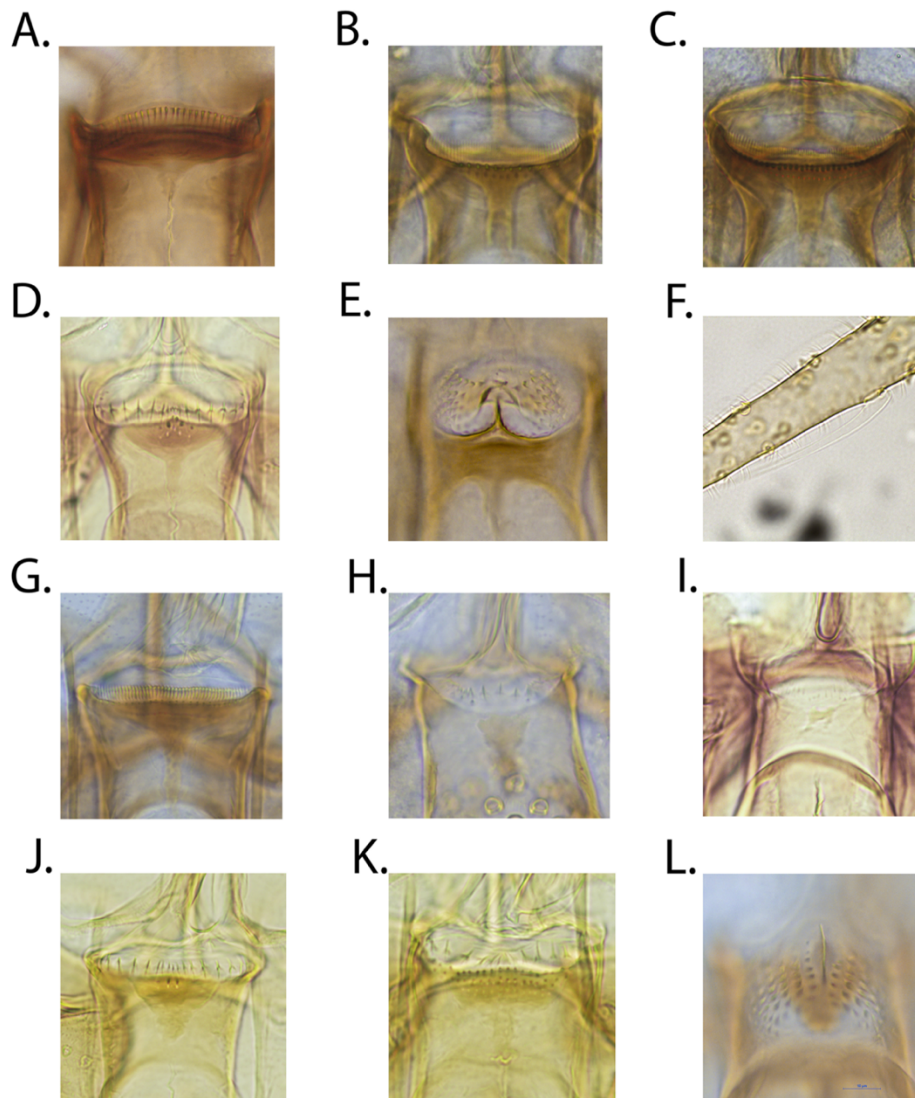
Giống Sergentomyia chiếm tỷ lệ cao nhất trong quần thể muỗi cát thu thập tại 6 tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam với 2067 cá thể, chiếm tỷ lệ 80%, trong đó có 7 loài đã được định danh.

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

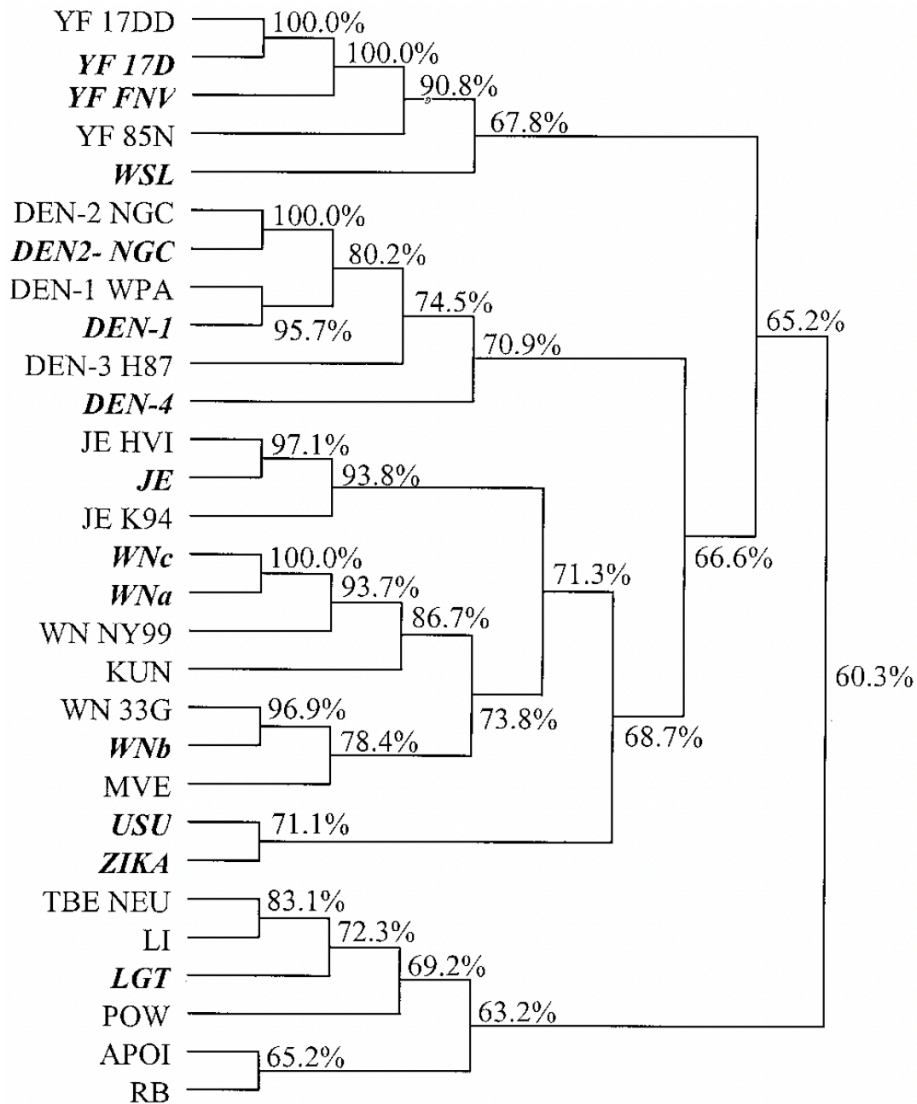
trong những “ổ bánh mỳ” này là nơi trú ẩn của các hang động và khe hở mà 55,36% số lượng muỗi cát đã được thu thập. Tất cả các giống và loài bao gồm cả *Se. sp2* và *Se. sp3* đã được báo cáo trong các môi trường cụ thể này. Các nghiên cứu trước đây được thực hiện ở Đông Nam Á (Thái Lan: $SR_{hang}=13$), 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 tỉnh 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 muối 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 cát 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 cát 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 cát, tuy nhiên qua nghiên cứu này chúng ta cũng nhận thấy việc muỗi cát 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 cát 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 RNA trên một véc tơ mới như muỗi cát 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 cát mang RNA 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 cát *Sergentomyia*.

4.2.2. Tỷ lệ nhiễm Flavivirus trên muỗi cát

Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy 0,198% quần thể muỗi cát cái thu thập tại thực địa nghi nhiễm Flavivirus, mang RNA 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 RNA 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 RNA 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 do Leishmania 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 DNA 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 do *Leishmania* 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 do *Leishmania* 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].

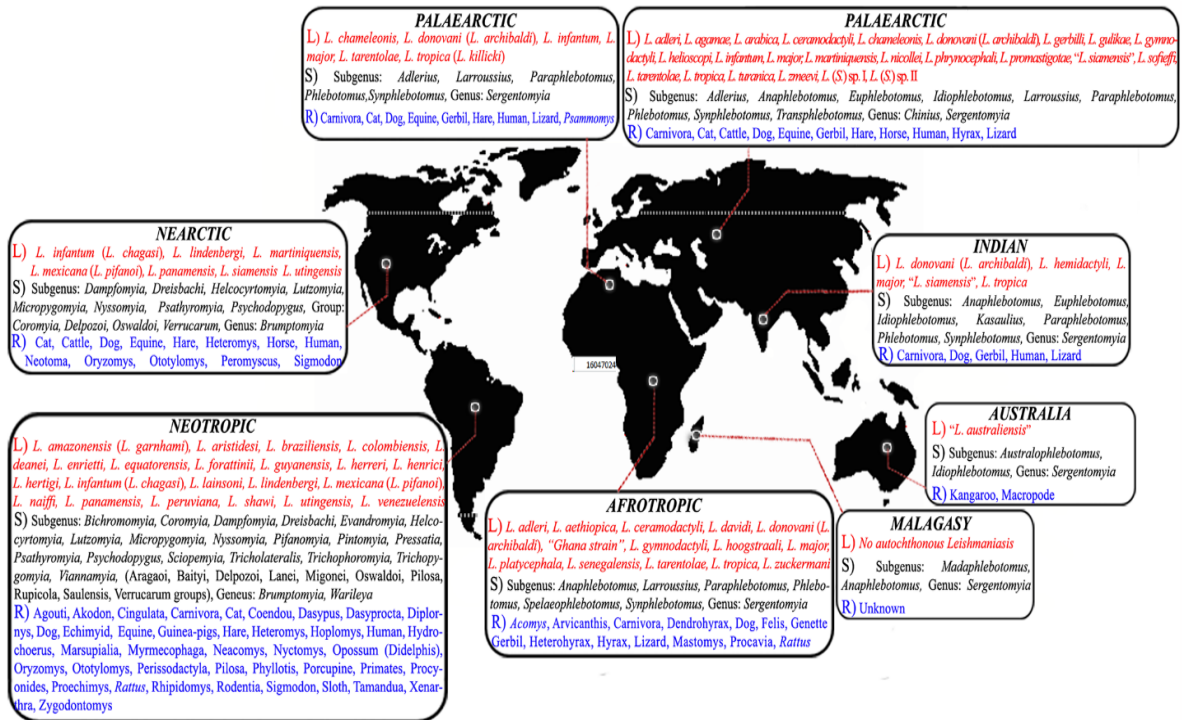
Tăng số mẫu so sánh, chúng tôi tiếp tục tiến hành so sánh với chủng *Leishmania chagasi* CP048191.1, *Leishmania infantum* FR796459.1 và một số chủng khác. Đặc điểm chung của các chủng này là đều gây ra bệnh thể VL, tuy nhiên đối tượng là khác nhau, một số chủng phân lập trên chó, một số chủng phân lập 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 do *Leishmania* 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 kinetoplast 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 kinetoplast 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. Chứng 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 do *Leishmania* cho người hoặc vật nuôi như chó hoặc mèo. *Leishmania infantum* là một trong những chủng chính gây nên bệnh do *Leishmania* 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 do *Leishmania*.

Hình 4.5 cho thấy Việt Nam là một nước chưa có số liệu báo cáo về phân bố địa lý của véc tơ muỗi cát, các loài *Leishmania* và ổ chứa động vật. Trong nghiên cứu này của chúng tôi đã cập nhật được loài *L. infantum* tìm thấy trên véc tơ muỗi cát thuộc cả 2 giống *Sergentomyia* và *Phlebotomus* tại hai tỉnh của Việt Nam là Ninh Bình và Sơn La, đây là lần đầu tiên ở Việt Nam có số liệu báo cáo về phân bố địa lý của muỗi cát và các loài *Leishmania*. Đồng thời với địa điểm nghiên cứu cũ đã từng ghi nhận ca bệnh do ký sinh trùng *Leishmania* gây ra ở Quảng Ninh, chúng tôi cũng có bằng chứng khẳng định lại sự có mặt của ký sinh trùng này trên cá thể muỗi cát cái thu thập được.

KẾT LUẬN

1. Thành phần loài và một số đặc điểm phân bố 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 1511 con đực (58,5%) và 1049 con cái (40,6%), ghi nhận 5 giống *Sergentomyia* chiếm cao nhất (n=2067; 79,96%), *Phlebotomus* (n=340; 13,15%), *Chinus* (n=31; 1,2%), *Idiophlebotomus* (n=14; 0,54%) và *Grassomyia* (n=6; 0,23%).

Tổng số 15 loài muỗi cát được ghi nhận thuộc 5 giống trên, trong đó có 13/15 loài được định danh: Giống *Sergentomyia* có 7 loài *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *sylvatica*, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *brevicaulis* group, *Sergentomyia* (*Parrotomyia*) *barraudi* group, *Sergentomyia* (*Sergentomyia*) *baillyi*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *hivernus*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*) *perturbans*, *Sergentomyia* (*Neophlebotomus*)

khawi; giống *Grassomyia* có 1 loài *Grassomyia indica*; giống *Phlebotomus* có 4 loài *Phlebotomus* (*Anaphlebotomus*) *stantoni*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *yunshengensis*, *Phlebotomus* (*Larrousius*) *betisi*, *Phlebotomus* (*Euphlebotomus*) *mascomai*; giống *Chinius* có 1 loài (*Chinius junlianensis*);

Hai muỗi cát chưa định danh là *Sergentomyia sp2.* và *Sergentomyia sp3.*

Muỗi cát ghi nhận có mặt ở tất cả các sinh cảnh: Trong hang động chiếm cao nhất (n=1431), tiếp đến ngoài nhà (n=936), chuồng gia súc (n=65), chuồng gia cầm (n=66), chuồng lợn (n=41), trong nhà (n=30), chuồng chó (n=16). Độ phong phú loài muỗi cát cao nhất là ở hang và sinh cảnh ngoài nhà (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 RNA vi rút DEN2 trong nghiên cứu là 0,198% (n=2) tại Ninh Bình trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* thu thập trong hang đá và tại Lạng Sơn trên muỗi cát cái *Sergentomyia barradi* thu thập ở trong hang đá.

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

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

Mẫu *Leishmania* spp. đầu tiên chưa khẳng định loài (tại Quảng Ninh) trên muỗi cát cái thu thập trong hang đá; Mẫu *Leishmania* spp. thứ 2 được khẳng định là *Leishmania infantum* thu thập tại Ninh Bình trên muỗi cát cái *Sergentomyia sp2* ở sinh cảnh ngoài nhà và mẫu *Leishmania* spp. thứ 3 cũng là *Leishmania infantum*, thu thập ngày 10/10/2016 tại Sơn La, được sàng lọc trên muỗi cát cái thuộc giống *Phlebotomus* ở trong chuồng lợn.

KHUYẾN NGHỊ

1. Mở rộng thêm các điều tra thu thập muỗi cát tại các tỉnh khác để có thêm số liệu so sánh với kết quả của nghiên cứu và xây dựng bản đồ phân bố muỗi cát;
2. Tiếp tục các nghiên cứu về hình thái học, sinh học phân tử để định loại chính xác các véc tơ muỗi cát truyền bệnh và làm rõ thêm vai trò của các tác nhân gây bệnh như Flavivirus đặc biệt là DEN2 và *Leishmania* spp. 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 khi có các bằng chứng tìm thấy RNA của DEN2 và *Leishmania* spp. trên muỗi cát cái.

TÍNH MỚI, TÍNH KHOA HỌC VÀ TÍNH THỰC TIỄN LUẬN ÁN

Luận án đã đóng góp một số điểm mới, tính khoa học và tính thực tiễn:

1. Tính mới:

- Là một nghiên cứu mới bao hàm nhiều nội dung liên quan đến đặc điểm dịch tễ phân bố của muỗi cát và thực trạng nhiễm tác nhân gây bệnh truyền nhiễm tại Việt Nam. Nghiên cứu đóng góp dữ liệu phân bố dịch tễ của 5 giống và 13 loài muỗi cát và 2 loài chưa định danh, vai trò trung gian truyền bệnh;
- Xác định bằng chứng muỗi cát cái mang tác nhân *Flavivirus* và ký sinh trùng đơn bào *Leishmania* spp. gây bệnh ở người, mở ra định hướng nghiên cứu trong tương lai, giúp các nhà dịch tễ, côn trùng, sinh học & sinh học phân tử và nhà lâm sàng truyền nhiễm nhận ra thêm căn nguyên bệnh truyền nhiễm đang nổi tại Việt Nam, nhất là khi nhiệt độ trái đất ấm dần lên-là điều kiện thời tiết tốt cho tăng quần thể muỗi cát do rút ngắn chu kỳ phát triển;
- Dù muỗi cát thường sống trong các hang động và ít ở khu vực dân cư nhưng hiện đã có bằng chứng có mặt ở bên ngoài hang động và chuồng vật nuôi ở vùng lưu hành, nên có thể đây là vấn đề mới cần quan tâm khía cạnh sức khỏe du lịch sinh thái, hang động và tại các vùng lưu hành muỗi cát này.

2. Tính khoa học

- Luận án vận dụng phương pháp và kỹ thuật nghiên cứu cổ điển hình thái, sinh học phân tử, giải trình tự gen để xác định giống, loài muỗi cát cũng như tác nhân gây bệnh *Flavivirus* và *Leishmania* spp. tại các tỉnh miền Bắc Việt Nam;
- Quá trình nghiên cứu có hợp tác giữa Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương với đối tác nghiên cứu tại Montpellier, Pháp nên kết quả đạt độ chính xác và tin cậy cao.

3. Tính thực tiễn

- Kết quả nghiên cứu trong luận án cung cấp dữ liệu mới, cảnh báo bệnh truyền nhiễm đang nổi tại Việt Nam, mở ra hướng nghiên cứu sâu trong tương lai về cả dịch tễ, vi sinh vật, lâm sàng và điều trị và biện pháp phòng chống;
- Dữ liệu nghiên cứu có thể là tài liệu tham khảo, thực hành lâm sàng và giảng dạy đại học và sau đại học về vi sinh, ký sinh trùng và côn trùng học.

MỘT SỐ ĐIỂM HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu đã phát hiện 2 loài muỗi cát mới là *Se. sp2* và *Se. sp3* nhưng chưa định loài. Do đó, thời gian đến tiếp tục thu thập thêm thông tin liên quan, đồng thời phối hợp với chuyên gia về muỗi cát trong và ngoài nước để khẳng định loài.

Việc tìm thấy bằng chứng *Leishmania* spp. trên quần thể muỗi cát cái ở Việt Nam là một phát hiện rất mới. Tuy nhiên, chưa làm rõ vai trò truyền ký sinh trùng đơn bào *Leishmania* spp. của loài muỗi cát ở Việt Nam, cần thêm bằng chứng bổ sung như khả năng lây truyền, sự nhân lên của vi rút trong cơ thể các muỗi cát đó. Trong tương lai, khi có thể nuôi, nhân dòng được loài muỗi cát, phân lập được các *Leishmania* spp. gây bệnh, sẽ giúp 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 đã phát hiện Flavivirus trên muỗi cát thông qua phân lập được các chủng vi rút, cho phép thu nhận được trình tự các đoạn gen vi rút hoàn chỉnh hơn. Trong nghiên cứu này, chưa phân lập nên kết quả chỉ dừng lại ở mức độ ghi nhận có bằng chứng có Flavivirus trên mẫu muỗi cát cái thu thập.

Mặt khác, các nghiên cứu trên thế giới cho thấy muỗi cát đực cũng có khả năng bị nhiễm Flavivirus, trong nghiên cứu này mới thực hiện sàng lọc trên muỗi cát cái. Do vậy, trong tương lai sẽ tiến hành trên cả các mẫu muỗi cát đực.

DANH MỤC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN LUẬN ÁN

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 Viết Hoàng, Vũ Thị Liễu, Nguyễn Thị Yên, Ứng 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, Nguyễn Văn Đề (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 Sốt xuất huyết Dengue Quốc gia (1999-2012). Báo cáo Công tác Phòng chống SXHD các năm, giai đoạn 1999-2012.
9. Đặng Thị Ánh Duyên và cs., (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 cs., (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, 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 cs., (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 Tiến (2010). *Giám sát và phòng chống dịch sốt Dengue và sốt Dengue xuất huyết*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

Tài liệu tiếng nước ngoài

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, E.F Rangel., Fiocruz Lainson, Ró de (2014). Classificação, morfologia, terminologia et identificação de Adultos: Bioecologia e Identificação de Phlebotominae. *Flebotomíneos do Brasil*, 367.
18. Eunice Aparecida Bianchi Galati (2003). Classificação de phlebotominae. *Flebotomíneos no Brasil*, 23-52.
19. N Léger, J Depaquit, 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):51-57.
20. J Raynal (1935). Contribution à l'étude des phlébotomes d'Indochine. *Arch. Inst. Pasteur Indochine*, (19):237-292.
21. J Raynal, H. Gaschen (1935). Sur les phlébotomes d'Indochine. IX. Phlebotomus sylvaticus n. sp. *Bull. Soc. Path. Ex.* (28):592-601.
22. J Raynal, 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):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):529-540.

24. Aurélie Thai (2004). *Contribution à la connaissance des phlébotomes (Diptera, Psychodidae) du Vietnam*.
25. Public Health Laboratory Network (2022). *Flavivirus laboratory case definition*. Canberra: PHLN, 2022.
26. Emily R Adams *et al.*, (2012). Leishmaniasis direct agglutination test: Using pictorials as training materials to reduce inter-reader variability and improve accuracy. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012 6(12):e1946.
27. Amir Ahmad Akhavan *et al.*, (2010). *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol*. 2010 Dec; 126(4): 552–556.
28. M. Akhoundi *et al.*, (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. (57):1-29.
29. M. Akhoundi *et al.*, (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sand flies. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(3):e0004349.
30. Mohammad Akhoundi *et al.*, (2013). Molecular characterization of *Leishmania* spp. in reservoir hosts in endemic foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Folia Parasitol (Praha)* 2013 Jul;60(3):218.
31. Benjamin M Akiyama *et al.*, (2016). Zika virus produces non-coding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science*, 354(6316):1148-1152.
32. Juan D Alfonzo, Otavio Thiemann, Larry (1997). The mechanism of U insertion/ deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. *Nucleic acids Research Simpson*, 25(19):3571-3759.
33. Cigdem Alkan *et al.*, (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):11773-11785.
34. J. Alvar *et al.*, (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5):e35671.

35. Chamnarn Apiwathnasorn *et al.*, (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):1405-1409.
36. AM Aransay *et al.*, (2000). Phylogenetic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology*, 9(2):157-168.
37. Kifaya Azmi *et al.*, (2010). Identification of Old World Leishmania species by PCR-RFLP of the 7 spliced leader RNA gene and reverse dot blot assay. *Trop Med Int Health*, 2010 Aug;15(8):872-80 15(8):872-880.
38. Y Ba *et al.*, (1999). Phlebotomus of Senegal: Survey of the fauna in the region of Kedougou: Isolation of arbovirus. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 92(2):131-135.
39. DC Barker *et al.*, (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology today*. 3(6):177-184.
40. Frank L Basiye *et al.*, (2010). Sensitivity and specificity of the *Leishmania* OligoC-test and NASBA-oligochromatography for diagnosis of visceral leishmaniasis in Kenya. *Trop Med Int Health*, 2010 Jul;15(7):806-10.
41. Esther Bensoussan *et al.*, (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2006 Apr; 44(4):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):925-939.
43. Bradley J. Blitvich, 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):1927-1959.
44. Constança Britto *et al.*, (1998). Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World Leishmania genomes. *Gene*, 222(1):107-117.

45. Grant L Campbell *et al.*, (2011). Estimated global incidence of Japanese encephalitis: A systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*. 89(10):766-774.
46. Cinzia Cantacessi *et al.*, (2015). The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol*, 2015 Mar;31(3):100-8
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):196-203.
48. JJ Castilla, M Sanchez-Moreno, C Mesa, A Osuna *et al.*, (1995). *Leishmania donovani*: *In vitro* culture and [1-H] NMR characterization of amastigote-like forms. *Mol Cell Biochem*, 142(2):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. *PLoS One*, 2014 Feb 13;9(2):e88845
50. Thomas J Chambers *et al.*, (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual review of Microbiology*, 44(1):649-688.
51. Mary B. Crabtree, Phan T. Nga, Barry R. Miller (2009). Isolation and characterization of a new mosquito flavivirus, Quang Binh virus from Vietnam. *Archives of Virology*, 154(5):857-860.
52. Elisa Cupolillo *et al.*, (1995). Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 1995 Jul;73(1-2):145-55.
53. MRB Da Silva, C H N Costa, M A P Oliveira *et al.*, (2015). Evaluation of an rK39-based immunochromatographic test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in human saliva. *Trop Biomed*, 2015 Jun;32(2):247-56
54. Simonne De Doncker *et al.*, (2005). A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects. 99(1):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 *L. cruzi* and *L. forattinii* (Diptera: Psychodidae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. *Acta Trop*, 2008 Jul;107(1):66-9 107(1):66-69.
57. J Depaquit *et al.*, (2007). *Chinius junlianensis* (Leng, 1987; Diptera: Psychodidae): New morphological data, 101(2):181-184.
58. Anna Dostálová, Petr Volf (2012). Leishmania development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. *Parasites vectors*. 5(1);1-12.
59. Tim Downing *et al.*, (2012). Genome-wide SNP and microsatellite variation illuminate population-level epidemiology in the *Leishmania donovani* species complex. *Infect Genet Evol*, 2012 Jan;12(1):149-59.
60. V. Duong, P. Dussart, P. Buchy *et al.*, (2017). Zika virus in Asia. *Int J Infect Dis*. (54):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. *Ann Trop Med Parasitol*, 2007Jul;101(5):399-407.
62. S Esseghir, PD Ready, R Ben-Ismail (2000). Speciation of *Phlebotomus* sandflies of the subgenus *Larroussius* coincided with the late Miocene-Pliocene aridification of the Mediterranean subregion. *Biological Journal of the Linnean Society*. 70(2):189-219.
63. Gamou Fall *et al.*, (2021). First detection of the West Nile virus Koutango lineage in sand flies in Niger. *Pathogens*. 10(3):257.
64. Octavio Fernandes *et al.*, (1994). Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*. 66(2):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. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2010 Jul-Aug;52(4):193-6.
66. Eunice AB Galati, Fredy Galvis-Ovallos, Phillip Lawyer *et al.*, (2017). An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite*, 2017; 24-26

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. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr; 41(4): 1419-1422.
68. Leslie S Gay *et al.*,(1996). The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*, 1996 May; 77(2):193-200.
69. Mehrdad Ghasemian *et al.*, (2014). Development and assessment of loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in Iran. *Iran J Parasitol.* 9(1):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. *Am J Trop Med Hyg*, 2002 Jan;66(1):91-102.
71. Laetitia Ninove, Gregory Moureau, Shelley Cook, Remi N. Charrel (2010). Flavivirus RNA in *Phlebotomine* Sand flies. *Vector-borne and zoonotic Diseases*, 10(2):195-197.
72. Eva Harris, G Kropp, A Belli, B Rodriguez, N Agabian *et al.*, (1998). Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol*, 1998 Jul;36(7):1989-95.
73. Andrew Haydock *et al.*, (2015). RNA-seq approaches for determining mRNA abundance in *Leishmania*. *Parasite Genomics Protocols*, Springer, 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):1-69.
75. Carolina Hernández *et al.*,(2014). Identification of six New World *Leishmania* species through the implementation of a high-resolution melting genotyping assay. *Parasit Vectors* 7(1):1-7.
76. Michael R Holbrook (2017). Historical perspectives on flavivirus research. *Viruses*, 9(5):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):871-8.

78. Mirsada Hukić *et al.*, (2020). A novel flavivirus strain detected in phlebotomine sand flies in Bosnia and Herzegovina. *Med Glas (Zenica)*, 17(2):301-307.
79. Andrew P Jackson *et al.*, (2016). Kinetoplastid phylogenomics reveals the evolutionary innovations associated with the origins of parasitism. *Curr Biol*, 2016 Jan 26(2):161-172.
80. Milan Jirkù *et al.*, (2006). Development of a direct species-specific PCR assay for differential diagnosis of *Leishmania tropica*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006 May;55(1):75-9 55(1):75-79.
81. H Johnson *et al.*, (1991). The identification of female sandflies of the subgenus Larrousius by the morphology of the spermathecal ducts. *Parassitologia*, (33):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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Feb;100(1):45-8 100(1):45-48.
83. Shaden Kamhawi *et al.*, (2004). A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*. 119(3):329-341.
84. Fritz H Kayser *et al.*, (2005). Medical microbiology, 493-499.
85. K Kertész *et al.*, (1903). Katalog der Palaë arktischen Dipteren, vol. 1, Budapest, Hungary, 382.
86. Mohd Shahar Khadri *et al.*, (2008). First description of the male of *Phlebotomus betisi* Lewis and Wharton, 1963 (Diptera: Psychodidae). 57(3):295-299.
87. Jeffrey S Kieft, Jennifer L Rabe, 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):1169-1177.
88. R. Killick-Kendrick, R. Lainson, J.A Rioux, V.M Sarjanova *et al.*, (1986). The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. *Coll. int. CNRS/INSERM*, 1984). IMEEE, Montpellier, 1986, 143-148.

89. Katrin Kuhls *et al.*, (2007). Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect*, 2007 Mar; 9(3):334-343.
90. Katrin Kuhls *et al.*, (2005). Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. 7(11-12):1224-1234.
91. Richard J. Kuhn (2002). Structure of Dengue virus: Implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 108(5):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. *Acta Trop*, 2010 Feb 113(2):202-206.
93. Laurence Lachaud *et al.*, (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. 40(1):210-215.
94. Richard P Lane (1993). Sand flies (Phlebotominae). *Medical insects and arachnids*, Springer, 78-119.
95. N Léger, J Depaquit, F Gay (2010). *Chinius eunicegalatiae* n.sp.(Diptera; Psychodidae): A cavernicolous sandfly from Laos. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*, 104(7):595-600.
96. Nicole Léger, Jérôme Depaquit, Frédérick Gay (2012). Description of the sandfly species *Chinius samarensis* n.sp. (Psychodidae; Diptera) from the Philippines. *Pathogens global health*, 106(6):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):311-317.
98. D. Lewis (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull Brit Mus Nat Hist*, 45(2):121-209.
99. D. Lewis (1987). Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the oriental region. *Systematic Entomology*, (12):163-180.
100. D. Lewis (1978). The Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) of the oriental region. *Bull Br Mus (Natural History)*, (37):217-343.

101. DJ Lewis, AL Dyce (1988). Taxonomy of the Australasian Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) with revision of genus *Sergentomyia* from the region. *Invertebrate Systematics*. 2(6):755-804.
102. DJ Lewis *et al.*, (1977). Proposals for a stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Systematic Entomology*, 2(4): 319-332.
103. Lixia Li, Jiping Li, Hongtao Jin, Limin Shang, Bo Li *et al.*, (2012). Detection of *Leishmania donovani* infection using magnetic beads-based serum peptide profiling by MALDI-TOF MS in mice model. *Parasitol Res*, 2012 Mar 110(3):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):6804-6818.
105. Elsy Nalleli, Loria-Cervera, Fernando José, São Paulo, Andrade-Narváez (2014). Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 56(1):1-11.
106. J. Lukes *et al.*, (2002). Kinetoplast DNA network: Evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. 1(4):495-502.
107. Julius Lukeš, Hassan Hashimi, Alena (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics Ziková*. 48(5):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):9375-9380.
109. Z. R. Lun *et al.*, (2015). Visceral leishmaniasis in China: An endemic disease under control. *Clin Microbiol Rev*. 28(4):987-1004.
110. C. Maia, J. Depaquit (2016). Can *Sergentomyia* (Diptera: Psychodidae) play a role in the transmission of mammal-infecting *Leishmania*?, *Parasite*. (23):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):1409-1411.
112. Jutta Marfurt *et al.*, (2003). Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. 46(2):115-124.
113. Jose María Requena *et al.*, (1997). Genes and chromosomes of *Leishmania infantum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 92(6):853-858.
114. P Minodier *et al.*, (1997). Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 35(10):2551-2555.
115. AM Montalvo *et al.*, (2012). Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 31(7):1453-1461.
116. MA Morales *et al.*, (2001). Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001 95(1):104-107.
117. Javier Moreno, Jorge Alvar (2002). Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9):399-405.
118. G Moureau, S Temmam, J P Gonzalez, G Grard, X de Lamballerie (2007). A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector-borne and zoonotic Diseases*, 7(4):467-478.
119. Frédérique Muller, Jérôme Depaquit, Nicole Léger (2007). *Phlebotomus (Euphlebotomus) mascomai* n.sp. (Diptera-Psychodidae). *Parasitology research*. 101(6):1597-1602.
120. PR Murray, KS Rosenthal, MA Pfaller (2015). *Medical microbiology*: Elsevier health sciences.
121. Abdelmajeed Nasereddin, 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):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):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. *J Clin Microbiol*, 1998 Oct36(10):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):250.
 125. Samwel Odiwuor *et al.*, (2011). Leishmania AFLP: Paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity. *Infect Genet Evol*, 2011 Jul 11(5):960-967.
 126. Fred R Opperdoes *et al.*, (2016). Comparative metabolism of free-living Bodo saltans and parasitic trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 2016 Sep 63(5):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). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002 Jul97(5):695-701.
 128. M Paiva-Cavalcanti *et al.*, (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania infantum* infection: A mini-review. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*, 16(4):537-542.
 129. WS Patton, Hindle (1926). The North Chinese species of the genus *Phlebotomus*. *Proc. Roy. Soc (B)*:405-412.
 130. Marvin R Paule, Robert J White (2000). Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic acids research*. 28(6):1283-1298.
 131. PP J Fauna SSSR Perfil'ev (1968). Phlebotomidae. *Translation of Perfil'ev*, 1966 Diptera: Family Phlebotomidae. (93):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*. *Med Entomol*. 54(2):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. *Am J Trop Med Hyg*, 1993 Sep, 49(3):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):1395-1404.
136. Fairchild G.B, Quate L.W (1961). Organ of the program Zoogeography and evolution of Pacific insects. *Pacific Insects*, 2(3):203-222.
137. Laurence, Quate L.W (1962). A review of the Indo-Chinese phlebotominae (Diptera: Psychodidae). *Pacific Insects*. 4(2):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. *Exp Parasitol*, 1996 Apr 82(3):242-250.
139. Christophe Ravel *et al.*, (2006). First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol*, 2006 Nov 36(13):1383-1388.
140. Dan S Ray *et al.*, (1989). Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Molecular and Cellular Biology*, 9(3):1365-1367.
141. PD Ready, 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): 726-733.
143. JA Rioux (1990). Taxonomy of *Leishmania*: Use of isoenzymes. suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65(3):111-125.
144. Philippe Rispaïl, Nicole Léger (1998). Numerical taxonomy of Old World Phlebotominae (Diptera: Psychodidae): Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93(6):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*. *Genome Res*, 2011 Dec, 21(12):2129-2142.
146. Giti Sadeghian *et al.*, (2013). Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol*, 2013 May 58(3):239.
147. Jovana Sadlova *et al.*, (2015). Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: A new laboratory model. *Parasit Vectors*, 2015 Mar 8(1):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. *J Clin Microbiol*, 2001 Mar 39(3):849-854.
149. Frederick Sanger *et al.*, (1978). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*. 1978. 265(5596):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): 1922-1927.
151. Richard Schodde, JH Calaby (1972). The biogeography of the Australo-Papuan bird and mammal faunas in relation to Torres strait. *Australian Journal of Zoology* 60(3):180-191
152. Gabriele Schönián *et al.*, (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003 Sep 47(1):349-358.
153. Gabriele Schönián *et al.*, (2001). Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001 Mar-Apr, 95(2):217-224.
154. Laura Schramm, Nouria Hernandez (2002). Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. *Genes development*. 16(20):2593-2620.

155. AK Seccombe, Paul Donald Ready, LM Huddleston (1993). A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Vol.88, Issue 6, Nov-Dec. 1994, 717.
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):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):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): 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):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. *Parasitology*, 1992 Oct;105 (Pt 2):183-92.
162. Barbara Sollner-Webb, Edward B Mougey (1991). News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends in biochemical sciences*. 16:58-62.
163. Tom Solomon *et al.*, (2004). Flavivirus encephalitis. *New England Journal of Medicine*. 351(4):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*. *Biochem J*, 2004 May 1 379(3):617-625.

165. Pimpilad Srisuton, 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. *Trends Biochem Sci*, 2005 Feb 30(2):97-105.
167. Nancy R Sturm *et al.*, (2001). *Diplonema* spp. possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *J Eukaryot Microbiol*, 2001 May-Jun 48(3):325-331.
168. Nancy R Sturm, Larry Simpson (1991). Leishmania tarentolae minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150bp from the conserved region. *Nucleic acids research*. 19(22):6277-6281.
169. Mei Jean Sue *et al.*, (2014). Application of PCR-ELISA in molecular diagnosis. *Biomed Res Int*. 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):949-955.
171. Nishi Suman Gupta (2011). Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. *The Indian journal of medical research*. 133(1):27.
172. Shyam Sundar (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. Clinical Rai and diagnostic laboratory immunology. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002 Sep 9(5):951-958.
173. Oskar J Bulletin Theodor (1948). Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Entomological Research*. 39(1):85-115.
174. Michel Tibayrenc *et al.*, (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993 Feb 15 90(4):1335-1339.
175. Mark Tilgner, Tia S Deas, 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):375-386.
176. Ana Lilia Torres-Machorro *et al.*, (2010). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: Witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews*, Vol34(1):59-86.
 177. Silvia RB Uliana *et al.*, (1996). Structural and functional characterization of the *Leishmania amazonensis* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasitol* 1996 Feb-Mar;76(1-2):245-55
 178. GJ Van Eys *et al.*, (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasite. *Mol Biochem Parasitol*. 1992 Mar;51(1):133-42
 179. Petr Volf *et al.*, (2007). Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *International Journal for Parasitology*. 37(6):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, 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):177-183.
 182. Regional office for South-East Asia World Health Organization (2010). Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser*(949):1-186.
 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 Nov.2011, New Delhi.
 184. Regional WHO Office for the Eastern Mediterranean (2014). Leishmaniasis.
 185. Shaofeng Yan *et al.*, (1999). Characterization of the *Leishmania donovani* ribosomal RNA promoter. *Mol Biochem Parasitol*, 15 103(2):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):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, Phillip G Lawyer (1987). New World vectors of the leishmaniasis. *Current topics in vector research*, Springer, 29-71.
189. DG Young, PV Perkins (1984). Phlebotomine sand flies of North America (Diptera: Psychodidae). *Mosquito News.* 44(2):263-304.
190. Adrian M Zelazny *et al.*, (2005). Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg*, 72(4):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):570-574.
192. Eva Zemanová *et al.*, (2004). Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: Correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 70(6):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):165-256.
194. D. Musso, D.J. Gubler (2016). Zika virus. *Clin Microbiol Rev.* 29(3):487-524.
195. A.R. Plourde, E.M. Bloch (2016). A literature review of Zika virus. *Emerg Infect Dis.* 22(7):1185-92.
196. J.J. Waggoner, B. A. Pinsky (2016). Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. *Clin Microbiol.* 54(4):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 Sẻ
 Weather: Sunny with clouds
 T°: 28°C
 H: 16°30

Head of mission: Ph. NAM

Team: Ana, Ni, Phuong, Yeu, P. Chau, Nam, Tu, Son, Huang, Nam 2

STATION INFO

Landlord's name: DAM QUANG HONG

Locality: (province/town/village) Tổ 17 khu 2A Phường Hồ Phụng GPS lat: 21.24.32.5
 long: 106.40.9 - 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 ST 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 → CDC = 8 = 11
 2 ST not sand fly
 7 not sand fly
 Lab → ST = 1
 CDC = 1
 SF = 2

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

Head of mission: Ph. Nam

Team: Nam, Nil, Anb, phuong, Yen
Son, tu, Chau, Hong
Nam 2

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village) NGUYEN VAN HOA GPS lat: 20.977.83
To 22 khu 2 B Phung ha phong - Hong gai Hoi long: 107.168.69
 alt: 27.m

General description: house in 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, figs
 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, Yen / 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's Duck | | |
| | 2 | behind house | | |
| | 3 | Pig house | | |
| | 4 | in the mountain / bamboo | Sf = 1 | ok |
| | 5 | inside house | Sf = 2 | ok |
| | 6 | chicken | | |

GENERAL COMMENTS

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

Mission number: 1
 Date: 02/06/2015
 Station n°/name: 12/ buffalo chick
 Weather: Sunny
 T°: 30
 Head of mission: Pu Nam
 Team:

STATION INFO

Landlord's name:

LUONG VAN DUNG

Locality: (province/town/village)

Dong Vei - Thang Nhat - Hoang Bo

GPS

lat: 21.65813

long: 107.19425

alt: 22

General description:

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

house

Animals: (yes/no) yes

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) Low

(species, health status,...)

chicken/ buffaloes

Humans: (yes/no) yes

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

5 people in family

Environmental description:

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

village - in front of rice field
stone pit - culture

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: 2

N° (1,2,...)

Localisation

Problems with traps

1

buffalo

2

chicken

sf=0

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Total SF = 3

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

Head of mission:

P. Nam

Team:

Nam, Van, Anne, Laure, Tu, Son
 Thao, Nguyen, Tu

STATION INFO

Landlord's name:

Dinh Văn Chấn (6 people, 2 children)

Locality: (province/town/village)

Thôn Sầm 3, Cúc Phương commune

GPS

lat: 22.14.45.7

long: 105.41.32.1

alt: 191

General description:

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

house, pigs farm, rocks and caves
 children, goats, deer, bees, dog

Animals: (yes/no) yes

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) high

(species, health status,...)

pigs (wild pig)
 chicken, goats, deer, bee,
 dog

Humans: (yes/no) yes

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

Environmental description:

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

rock, caves and pig farm (wild pigs)
 bees (no insecticide)

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: 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)

GPS

lat: 20.08.48

23th hamlet, Nam Son commune, TĐH district

long: 105.52.23.6

alt: 66

General description:

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

house next to the mountain

Animals: (yes/no) ✓

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) _____

(species, health status,...)

chicken, ~~egg~~

Humans: (yes/no) ✓

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

4 (2 children)

Environmental description:

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

house, chicken, rock

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

Mission number: 3/long San
Date: 1/8/2016
Station n°/name: 39/1 House: 1
Weather: sunny with clouds
T°: 38°C

Head of mission: Prof. Viet Smith Nam
Team: Yen, Son, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Vi Xuân Tiên - SĐT 0163 2835780

Locality: (province/town/village) Khôi & Phung Tam Thanh
GPS lat: 21.51.375
long: 106.45.103 - 267m
alt: 267m

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
(Forest, type of vegetation, cave behind the house
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: 3 | N° (1,2,...) | Localisation | Problems with traps | ST |
|------------------|--------------|------------------------|---------------------|----|
| 1 | 1 | big pig - chicken cage | | 0 |
| 2 | 2 | Cave | | 10 |
| 3 | 3 | chicken cage | | 0 |
| | | | | |
| Total | | | | 10 |

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

Mission number: 3/ Lang San
 Date: 11/12/2016
 Station n°/name: 43/ house - 4 (ST5)
 Weather: Sunny
 T°: 33°C

Head of mission: Prof. Dr. Sinh Nien
 Team: San, Yen, Phuong, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Ng° Van Sy - Sdt. 0988.733.427

Locality: (province/town/village) FB'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 if yes, detail: chickens, dogs, pigs
 Density: (high/mid/low) low (species, health status...)

Humans: (yes/no) yes if yes, detail: 5 ppl. - family
 (n° of persons, activity...)

Environmental description: behind the house - rock hill
 (Forest, type of vegetation, close to the house under construction
 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 | CP |
|-------------------------|--------------|-------------------------|----------------------|-----------|
| | 1 | chicken cage | dogs with small hole | 0 |
| | 2 | pig cage - 1 | | 4 |
| | 3 | House - rock - have pig | | 1 |
| | 4 | pig cage - 2 | | 0 |
| | | | | Total = 2 |

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 (bat cave) - Svachien

Locality: (province/town/village) Dg Van Vi - Chitang - Tp Lang Son
 GPS lat: 21.50.129
 long: 106.45.436
 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: 6 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 | Deepest 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: 22/08/2016
 Station n°/name: 62
 Weather: rainy
 T°: 26°C

Head of mission:

Team: Yên, Công, Cường, Linh

STATION INFO

Landlord's name: Nguyễn Văn La

Locality: (province/town/village) Thị trấn Mường Vi, Lào Cai GPS lat: N. 22° 32' 47"
Núi Rín / Lào Cáo - Bát Sắt - Mường Vi - Núi Rín long: E. 103° 47' 54"
 alt: 442 m

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

Animals: (yes/no) yes if yes, detail: goats, horses, buffalo, chickens, geese
 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 |
|-------------------------|--------------|-------------------------------|---|
| | <u>1</u> | <u>buffalo and goat place</u> | <u>pic 1</u> |
| | <u>2</u> | <u>horse place</u> | <u>pic 2</u> |
| | <u>3</u> | <u>tree</u> | <u>hang on tree near rock, house</u> |
| | <u>4</u> | <u>house</u> | <u>under the rock, behind the house near trees, grasses and rocks</u> |
| | <u>5</u> | <u>pigsty</u> | <u>behind the house, near the rocks, grasses, large trees</u> |
| | <u>6</u> | <u>tree</u> | <u>with rocks, grasses, trees</u> |

GENERAL COMMENTS
 (all important details, pictures...) No sand fly

Mission number: 4
 Date: 24/11/2016
 Station n°/name: 71
 Weather: Sunny
 T°: 28.6

Head of mission:
 Team: Yen, Sen, Linh, Quynh

STATION INFO
 Landlord's name: ly A pho
 Locality: (province/town/village) Lai Cai - Sapu - Hoi Thau - Hang Do
 GPS lat: N. 22° 19' 55.2"
 long: E 106° 52' 22.9"
 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: N. 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 |
|-------------------------|--------------|---------------|--------------------------|
| | <u>1</u> | <u>pigsty</u> | <u>in front of house</u> |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

GENERAL COMMENTS
 all important details, pictures... OK: 0

Mission number: 4
 Date: 25/08/2016
 Station n°/name: 77
 Weather: Sunny
 T°: 27°C

Head of mission:

Team:

Yen, Son, Linh, Quynh

STATION INFO

Landlord's name:

Vũ Văn Thỉnh

Locality: (province/town/village)

GPS

lat: N 22° 20' 53.5"

lao Cai - Bao Thây - Xóm Quynh Thôn Thây' V5

long: E 104° 17' 10.1"

alt: 173 m

General description:

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

house in village and chicken farm

Animals: (yes/no) Yes

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) High

(species, health status,...)

chickens, pigs, dogs

Humans: (yes/no) Yes

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

6 with 1 child

Environmental description:

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

house in village border by mountain, has garden, banana trees, chickens, pigs, langan trees, bamboo grove

TRAP INFO

Number of Sticky Traps installed: 12

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

1

behind house

2

bamboo

3

pigsty

4

house

/ near pigsty → unwork.

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 / HA GIANG
 Date: 5/09/2016
 Station n°/name: 78
 Weather: Sunny, cloudy
 T°: 34

Head of mission:
 Team: Anne, Yee, Tu, Van, Ky, Thien

STATION INFO

Landlord's name: Phan Thi Chay

Locality: (province/town/village) Lũng West Hamlet, Ngoc Linh Commune GPS lat: 22°42'00"
 long: 104°59'35"
 alt: 1000m

General description: house with poutung, rice field, coin
 (house, farm, rural area, village, cave...) nut tree, road area

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

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

Environmental description: mountain, forest, rock, ricefield, coin
 (Forest, type of vegetation, rocks invaded by forest
 microhabitats, burrows, rocks, river, ...) 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: 1

| 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: 5/09/2016
 Station n°/name: 82
 Weather: cloudy
 T°: 23

Head of mission: _____

Team: _____

STATION INFO

Landlord's name: _____

Locality: (province/town/village)

GPS

lat: 22.40.09

long: 105.04.34

alt: 122 m

Khay Kha hamlet, N1 commune
Vi Xuyen dist, Va Gai, province

General description:

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

house behind mountain, farm
wal area, forest

Animals: (yes/no) Y

if yes, detail:

Density: (high/mid/low) mid

(species, health status,...)

buffalo, chicken

Humans: (yes/no) Y

if yes, detail:

(n° of persons, activity,...)

2

Environmental description:

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

wood house, rice field, buffalo 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: 2

N° (1,2,...)

Localisation

Problems with traps

00

1

buffalo farm

2

forest

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

mission number: 5
 date: 08/09/2016
 station n°/name: 94/120
 weather: Sunny
 ? : 20°C

Head of mission: _____
 Team: _____

STATION INFO

landlord's name: _____

locality: (province/town/village)

GPS

lat: 22.49.628

long: 104.58.783

alt: 132

general description:

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

border of the town, behind hug's home.
house against rock mountain

animals: (yes/no) yes

if yes, detail:

(species, health status, ...)

chicken and duck

density: (high/mid/low) mid

humans: (yes/no) yes

if yes, detail:

(n° of persons, activity, ...)

many houses

environmental description:

forest, type of vegetation,

microhabitats, burrows, rocks, river, ...)

urban area, House against rock
mountain, chicken, House behind
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: 1

N° (1,2,...)

Localisation

Problems with traps

SF SF lab

CDC 1

near behind hug's house
near chicken farm

8 - 1 7

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
 Station n°/name: 9
 Weather: cloudy
 Head of mission: Prof Nam
 Team:

STATION INFO

Landlord's name: Ng Van Thang
 Locality: (province/town/village) Son La / Mai Son / G. N. commune
 GPS lat: 21° 28' 22.7"
 long: 104° 08' 21.6"
 alt: 653
19/5 hamlet

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 (kinh)
 (n° of persons, activity, ...)

Environmental description: xigacane, bamboo, longan
 (forest, type of vegetation, rock, soil, bean, pig farm)
 Microhabitats, burrows, rocks, river, ...

RAP 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: <u>3</u> | N° (1,2,...) | Localisation | Problems with traps | SF Lab |
|-------------------------|--------------|---------------|---------------------|----------------|
| <u>202</u> | <u>1</u> | <u>cave 1</u> | <u>rock hole</u> | <u>203</u> |
| <u>07</u> | <u>2</u> | <u>cave 2</u> | <u>rock hole</u> | <u>08</u> |
| <u>50</u> | <u>3</u> | <u>cave 3</u> | <u>rock hole</u> | <u>50</u> |
| <u>260</u> | <u>4</u> | <u>cave 4</u> | <u>rock hole</u> | <u>50</u> |
| | | | | <u>(Σ=261)</u> |

GENERAL COMMENTS

(all important details, pictures...)

Mission number: 6
 Date: 13/10/2016
 Station n°/name: S119
 Weather:
 Head of mission:
 Team:

STATION INFO
 Landlord's name: Ng. Duong Han
 Locality: (province/town/village) Mu Banlet, Chiang Xom community, St. city, Laos GPS lat: 21.22.97.1 long: 102.54.89.0 alt: 586m
 General description: bamboo house + pigeon farm + mountain
 (house, farm, rural area, village, cave, ...)
 Animals: (yes/no) / if yes, detail: pigeon + chicken
 Density: (high/mid/low) / (species, health status, ...)
 Humans: (yes/no) / if yes, detail: 4 (Kinh)
 (n° of persons, activity, ...)
 Environmental description: bamboo house, rock, 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 | Σ F | 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 | |
| | | | | Σ 15 | (Σ=15) |

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

mission number: 6
 date: 22/10/16
 station n°/name: S116
 weather: cloudy
 : 27°C

Head of mission: Yên
 Team: Tú, Yên, Sơn, Phấn, Thảo

LOCATION INFO
 landlord's name: Tổng Thị Xuân
 locality: (province/town/village) Phước Hải, huyện Chiêm Khê, tỉnh Khánh Hòa
 GPS lat: 12° 24' 0.1"
 long: 102° 55' 25.8"
 alt: 512 m
 general description: house + rocky mountain + pig place
 use, farm, rural area, village, cave...
 animals: (yes/no) Y if yes, detail: pigs, dogs, duck, chicken
 density: (high/mid/low) Y (species, health status, ...)
 humans: (yes/no) Y if yes, detail: 6 (2) children
 (n° of persons, activity, ...)
 environmental description: house next to mountain + caves, animal place
 forest, type of vegetation, bamboo, jack fruit, banana
 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: | N° (1,2,...) | Localisation | Problems with traps | SF | Lab |
|----------------------|--------------|--------------|---------------------|------|------|
| CAVE CDC 1 | | | | 8 | |
| CAVE CDC 2 | | | | 0 | |
| CAVE CDC 3 | | | | 1 | |
| PIGLAND CDC 4 | | | | 2 | |
| INSIDE HOUSE CDC 5 | | | biting off | 0 | |
| | | | | Σ 16 | Σ 16 |

GENERAL COMMENTS

all important details, pictures...

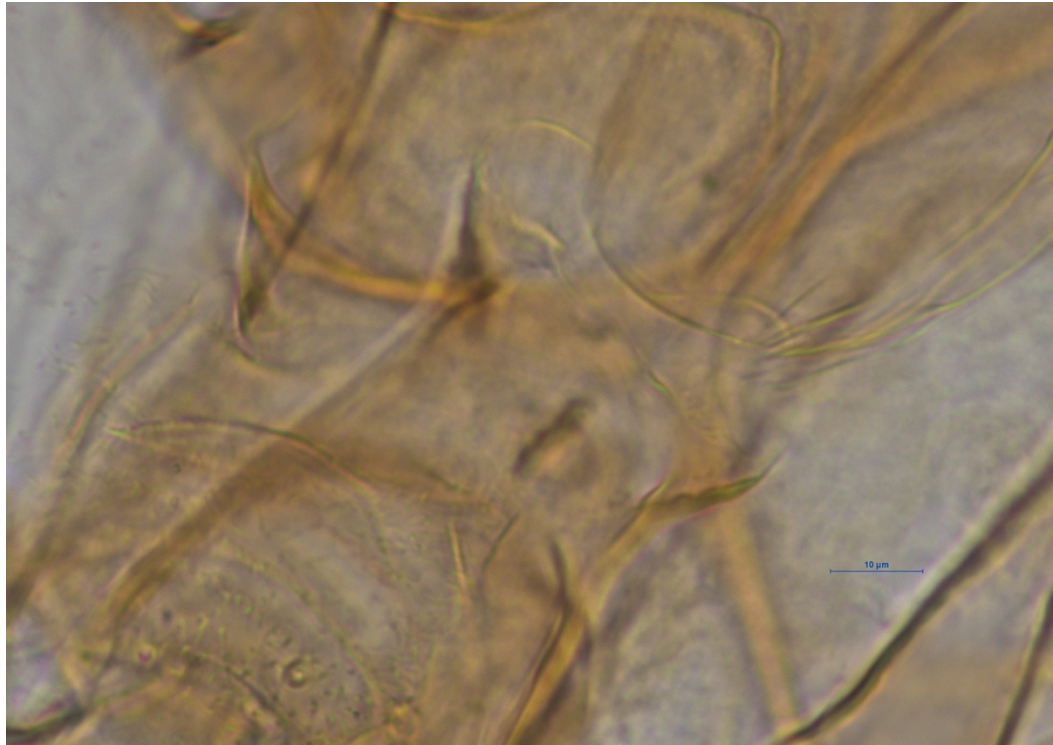
Mission 6 : Sơn La

Day 1 : 300 3/3
 Day 2 : 47 1/8
 Day 3 : 53 5/3
 Day 4 : 22 7/2

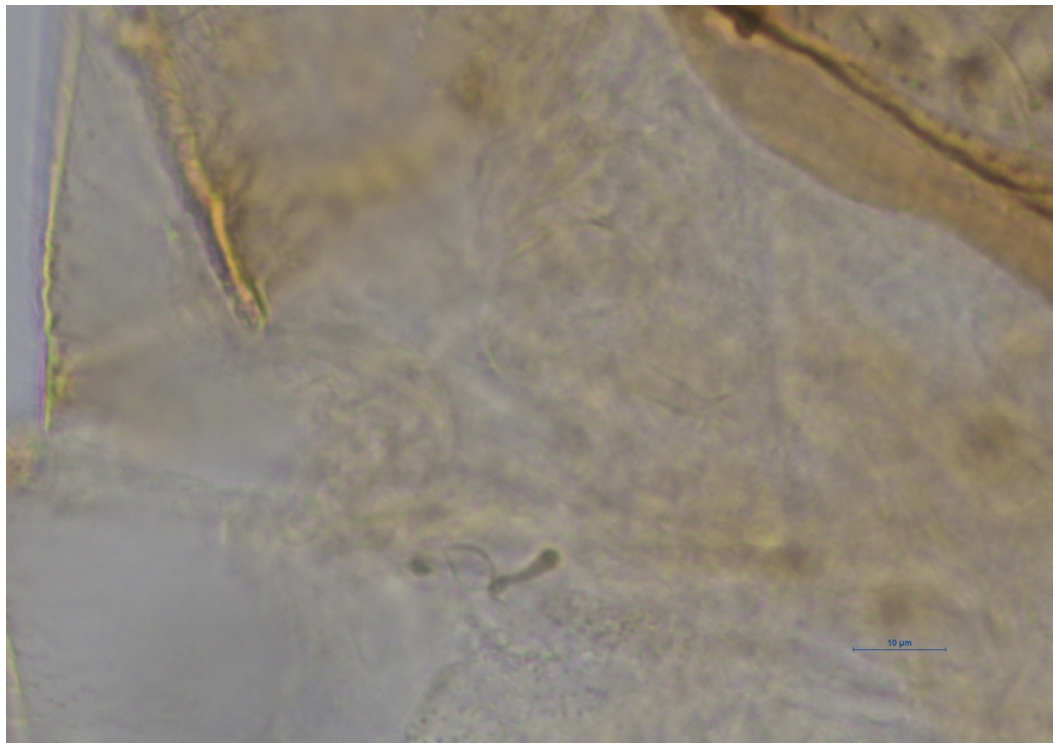
SF : 472 486

Mission 6

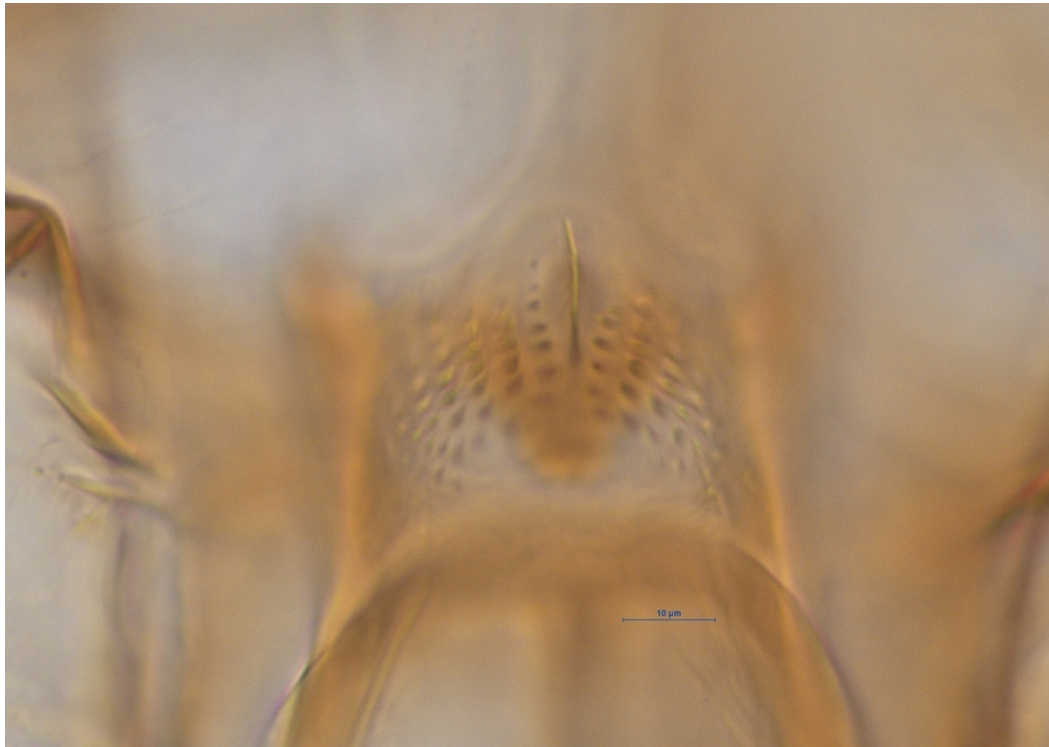
Phụ lục 02: Hình ảnh chụp tiêu bản muối cát



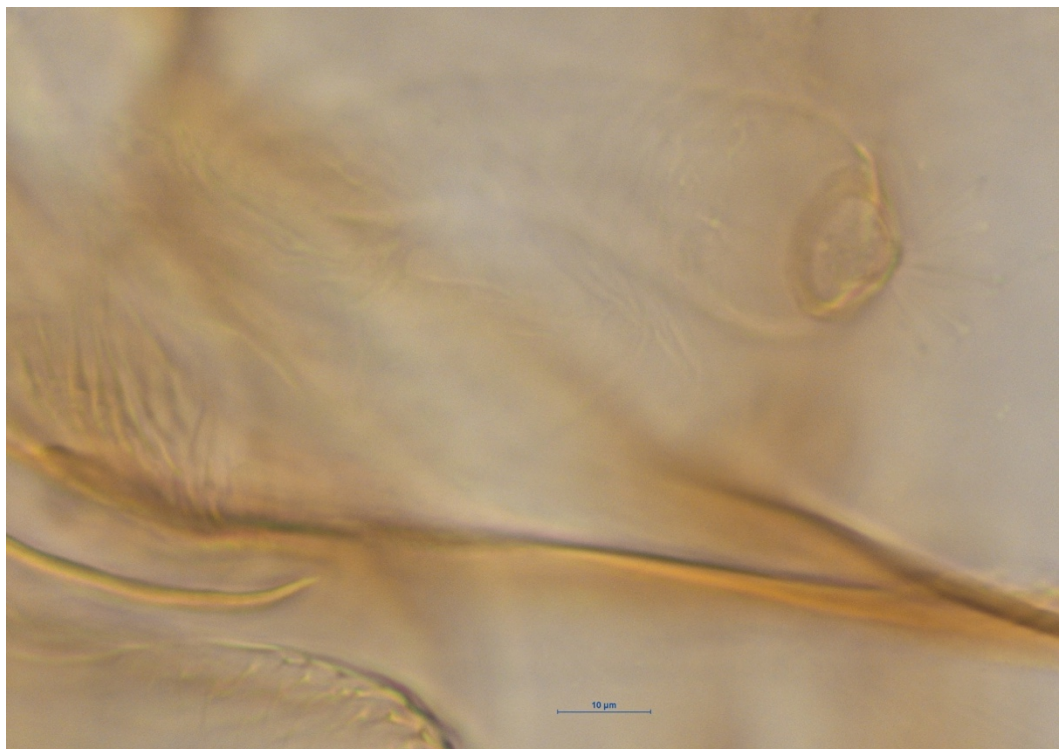
Hàm của *Ch.junlianesis* chụp ở vật kính x60



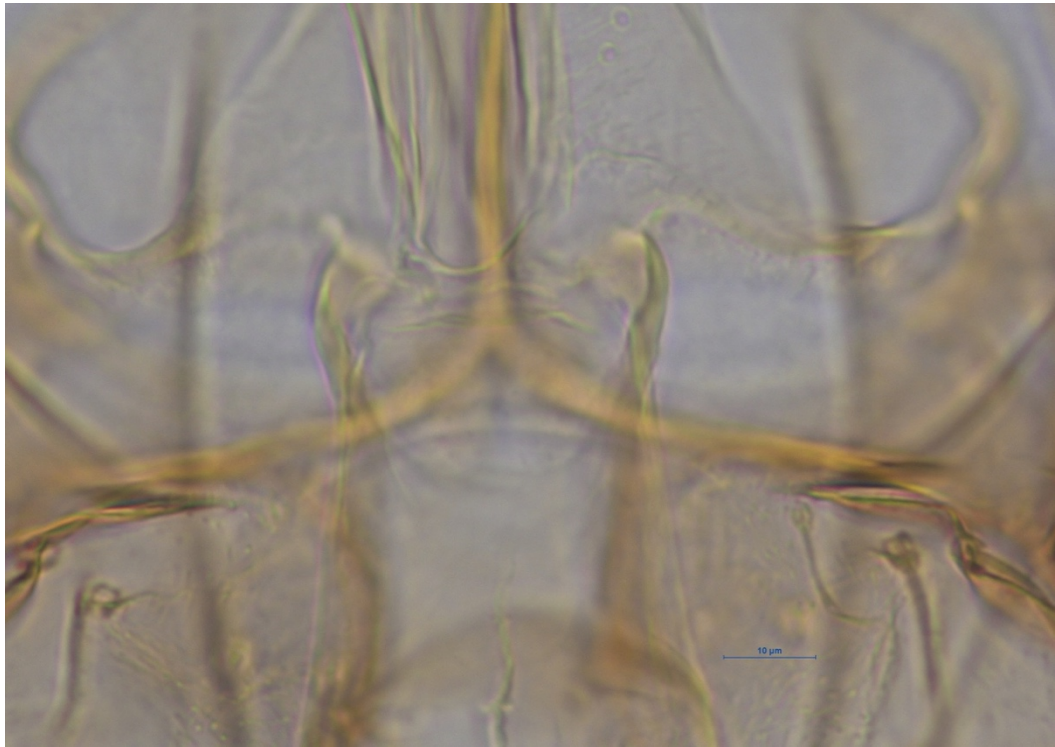
Túi chứa tinh của *Ch.junlianesis* chụp ở vật kính x60



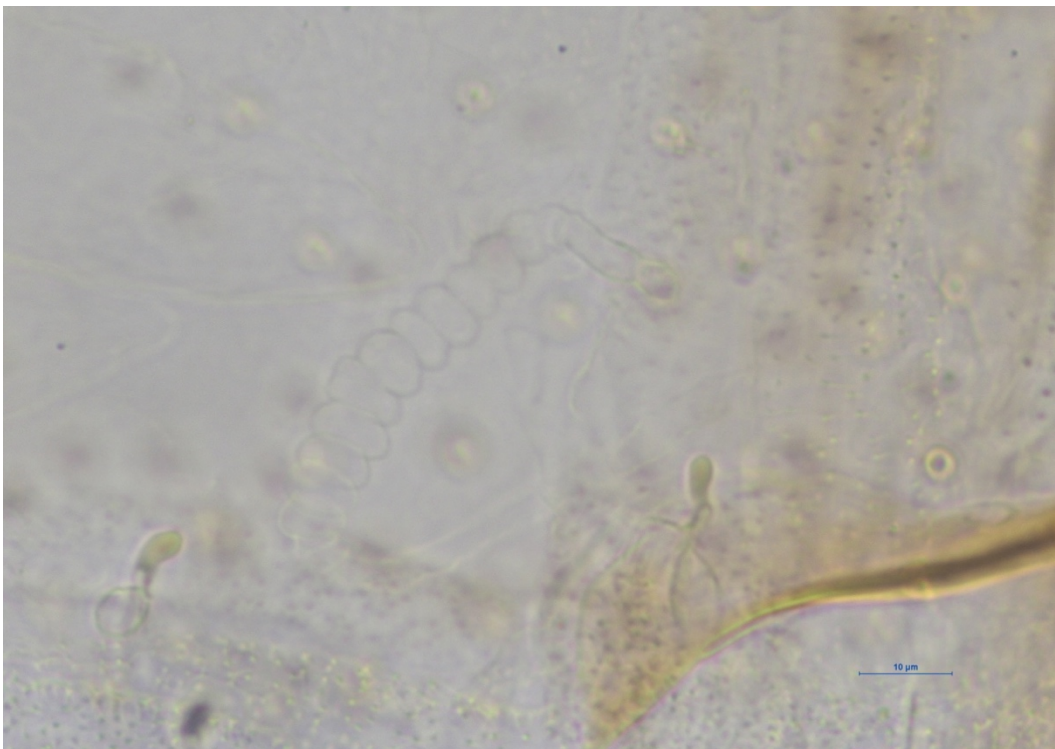
Hàm của *Id. longiforceps* chụp ở vật kính x60



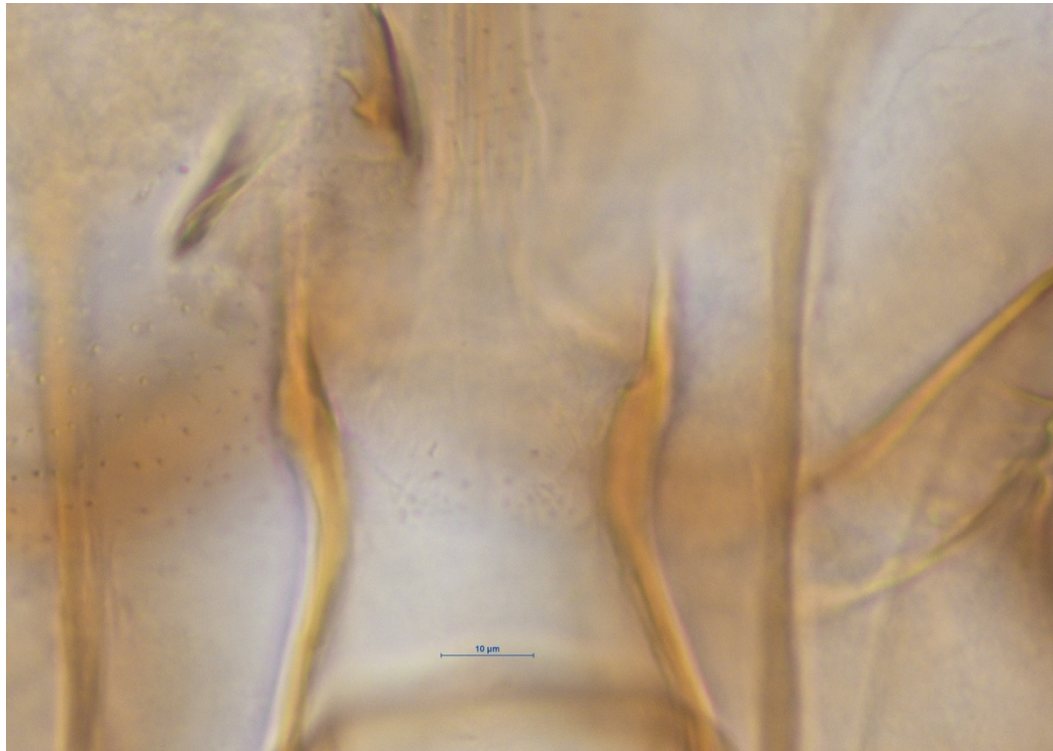
Túi chứa tinh của *Id. longiforceps* chụp ở vật kính x60



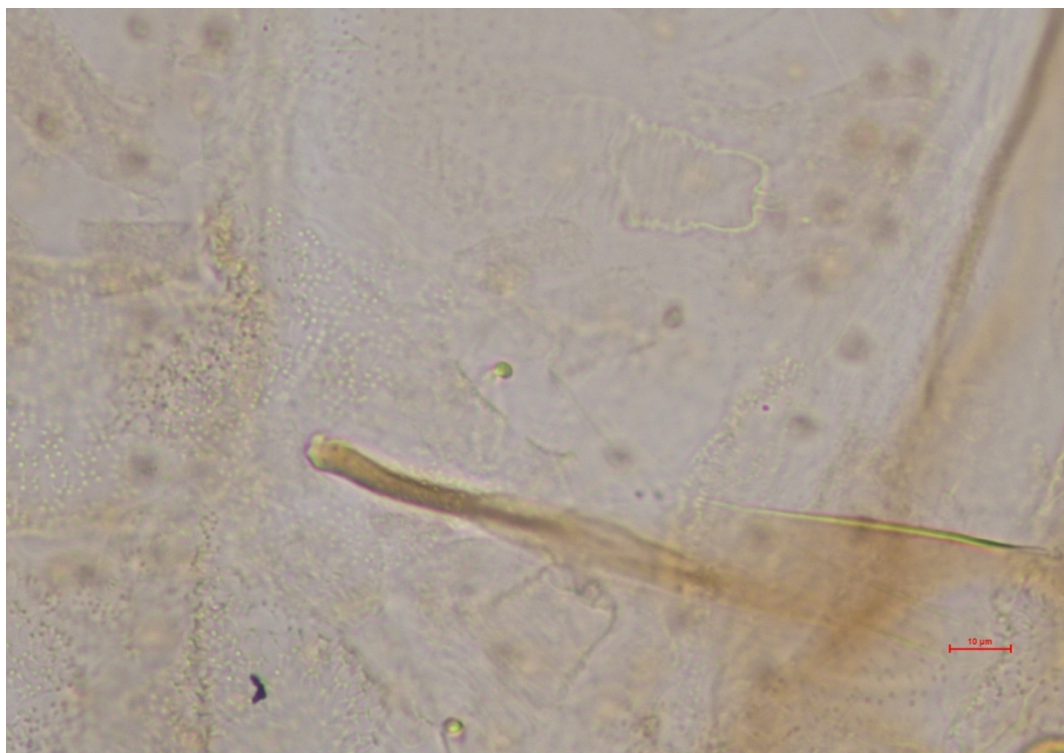
Hàm của *Ph. betisi* chụp ở vật kính x60



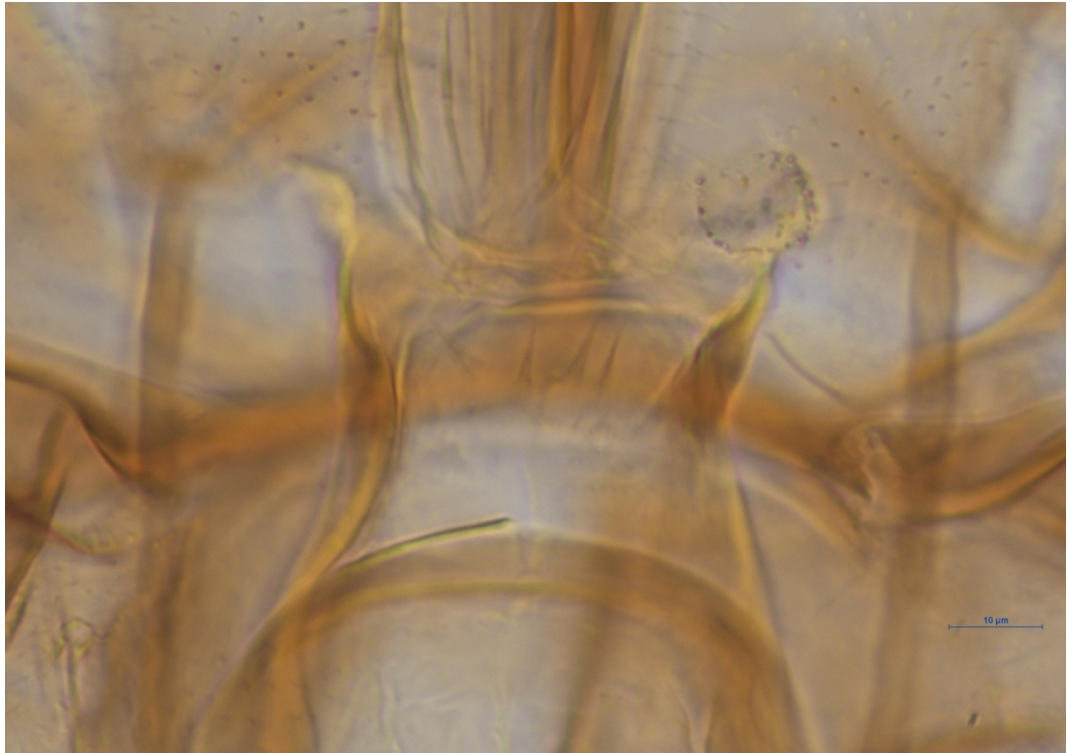
Túi chứa tinh của *Ph. betisi* chụp ở vật kính x60



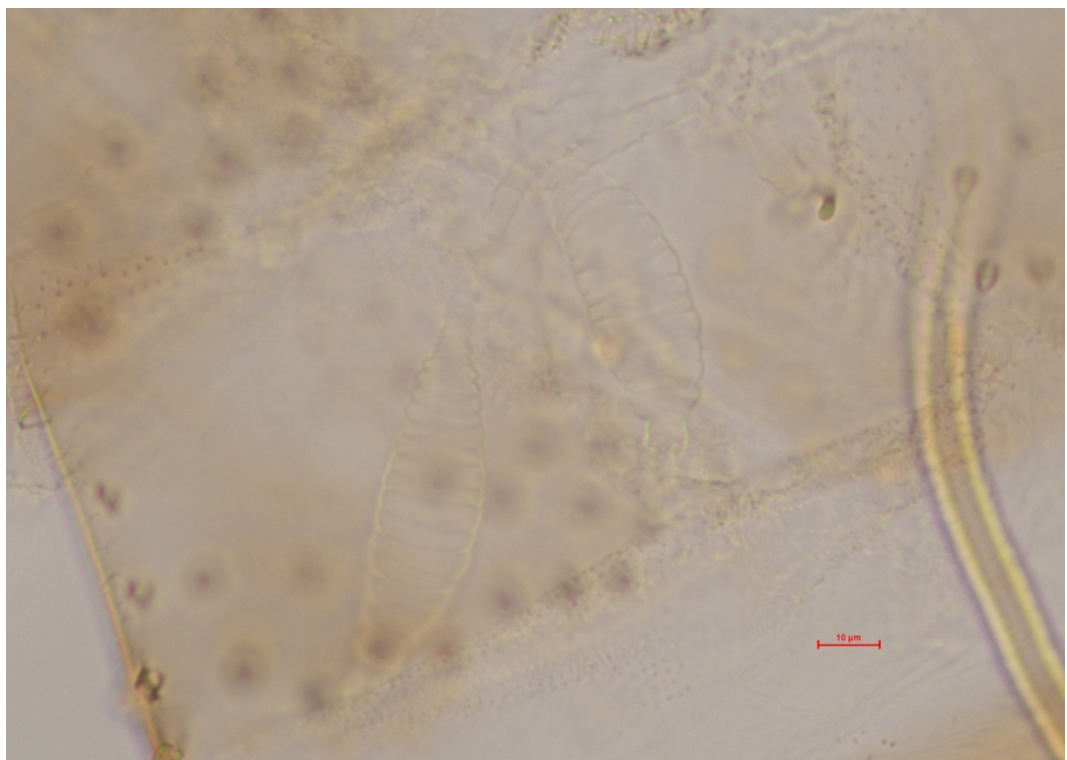
Hàm của *Ph. mascomai* chụp ở vật kính x60



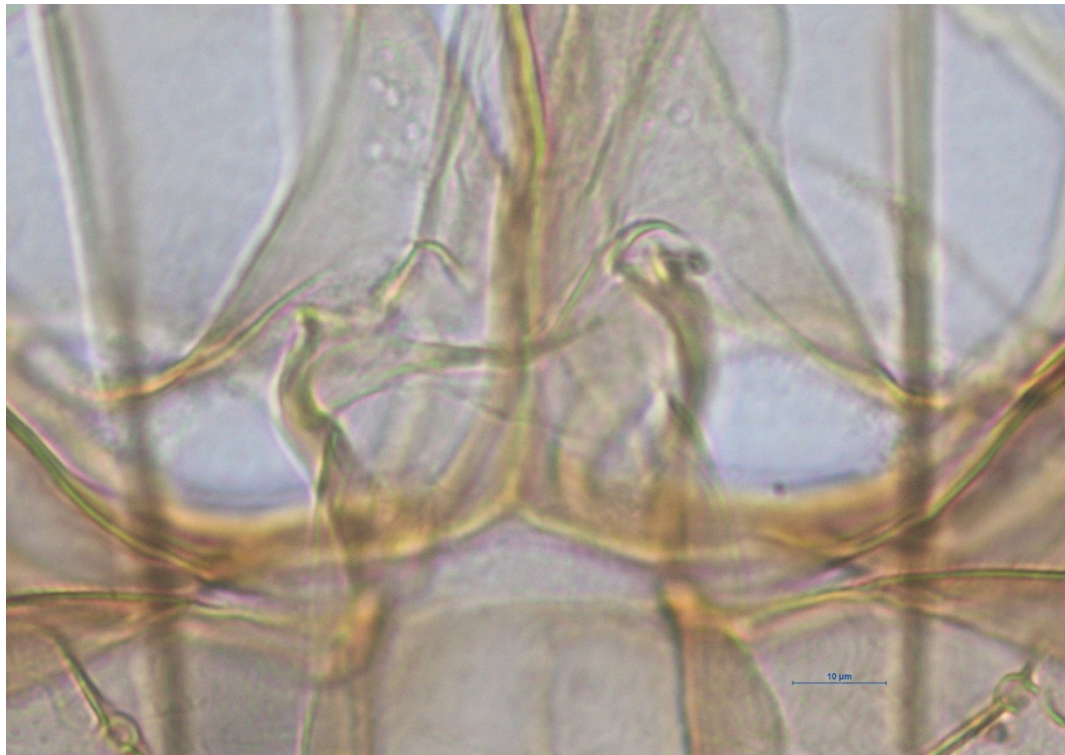
Túi chứa tinh của *Ph. mascomai* chụp ở vật kính x40



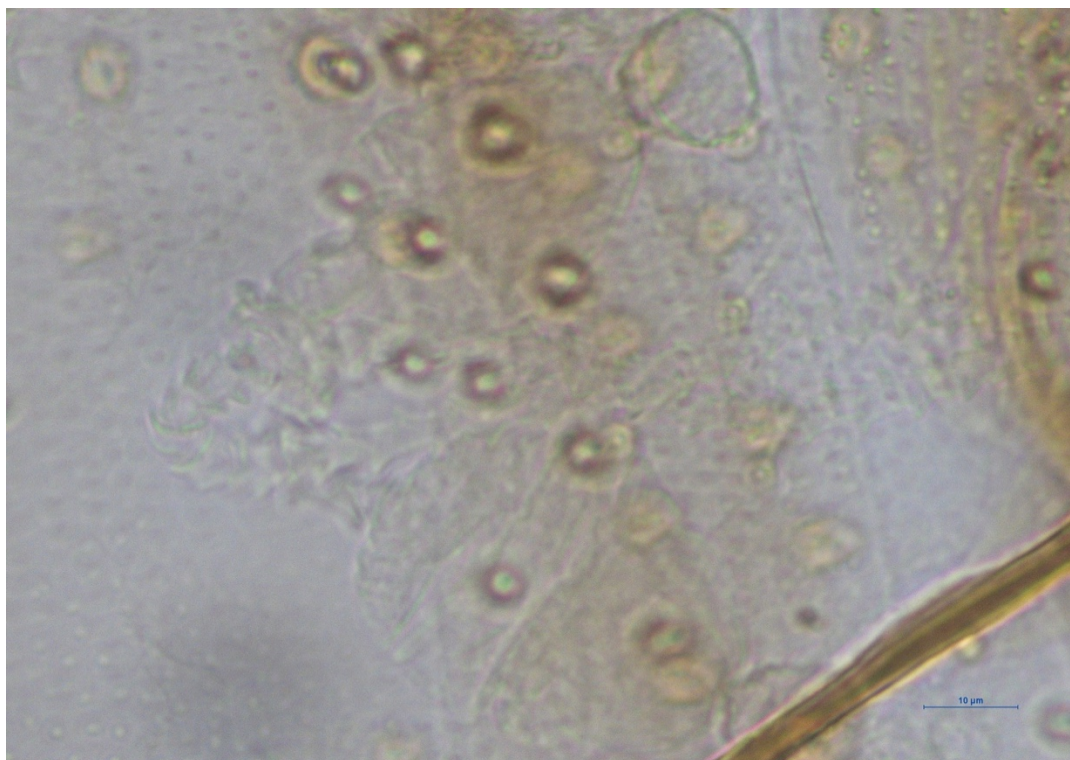
Hàm của *Ph. stantoni* chụp ở vật kính x60



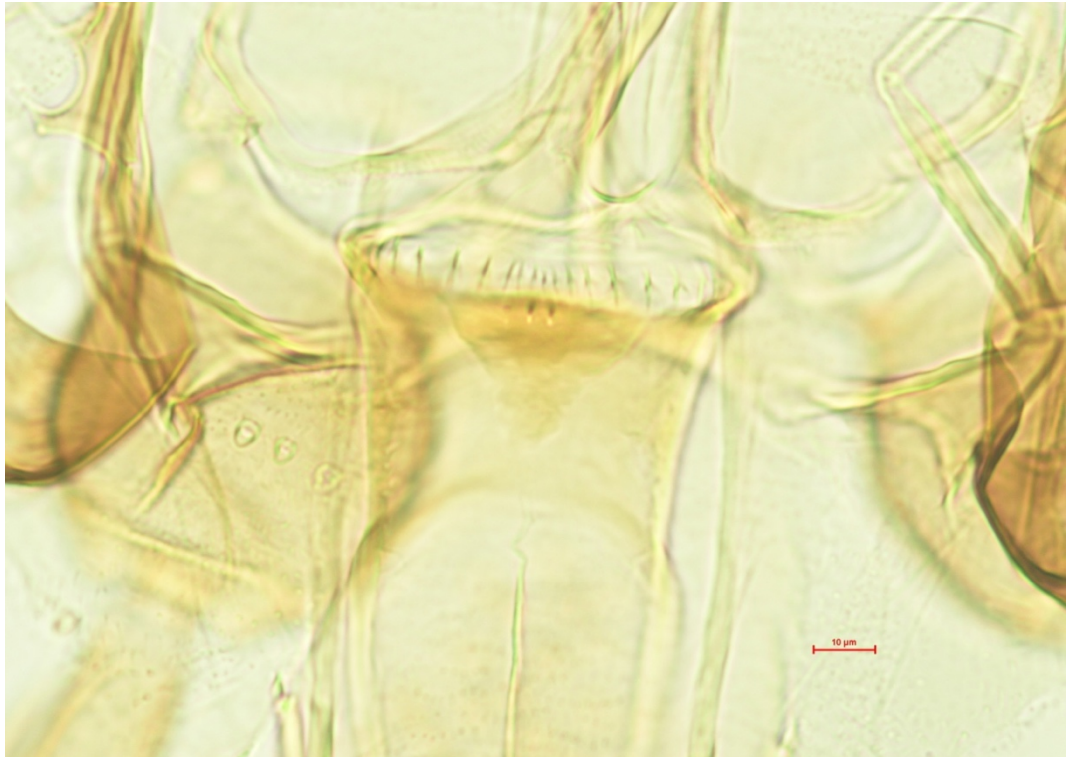
Túi chứa tinh của *Ph. stantoni* chụp ở vật kính x40



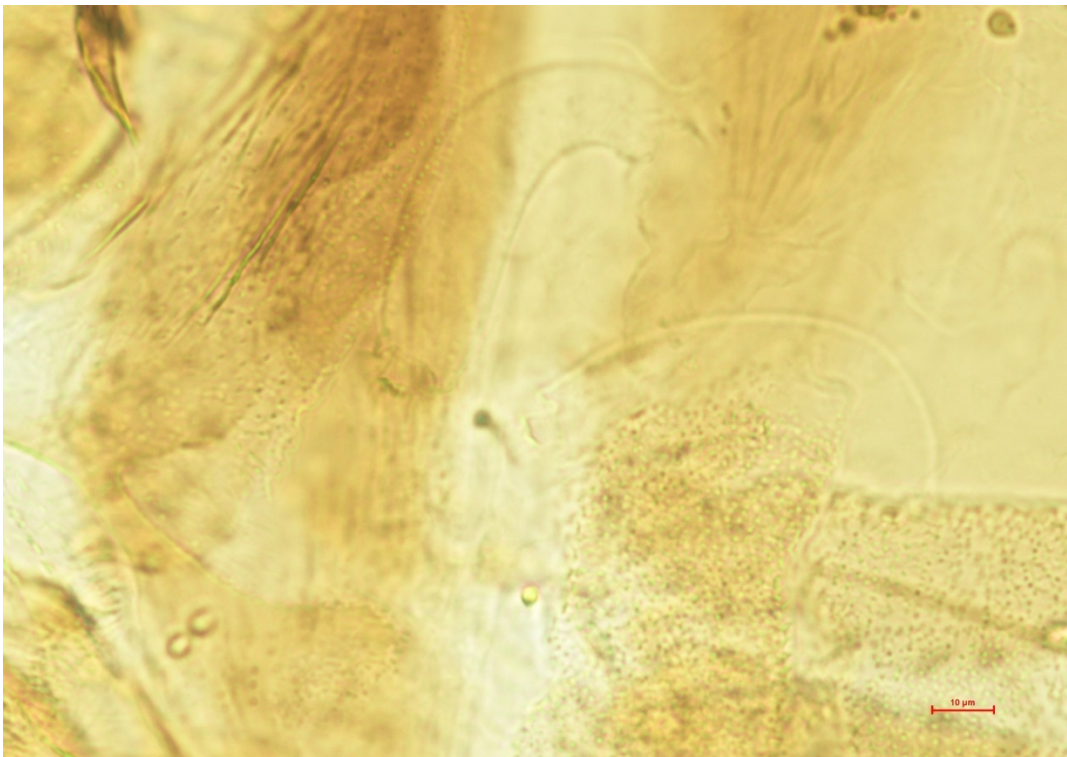
Hàm của *Ph.yunshengensis* chụp ở vật kính x60



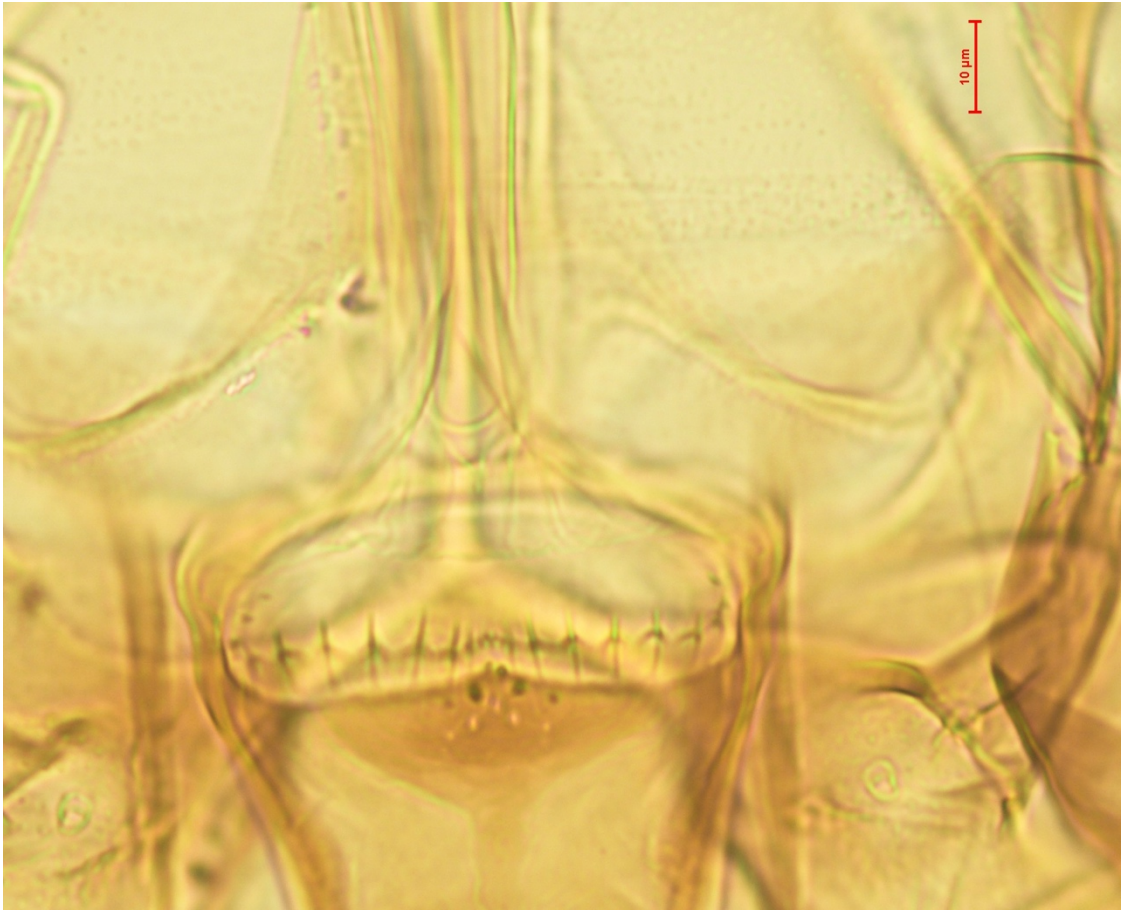
Túi chứa tinh của *Ph.yunshengensis* chụp ở vật kính x60



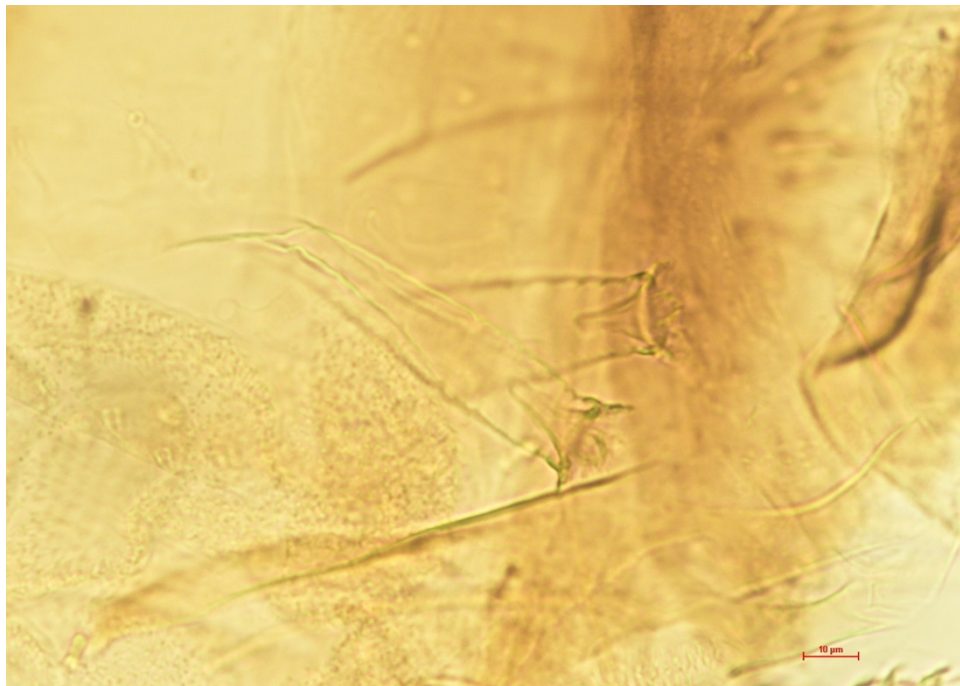
Hàm của *Se. hivernus* chụp ở vật kính x40



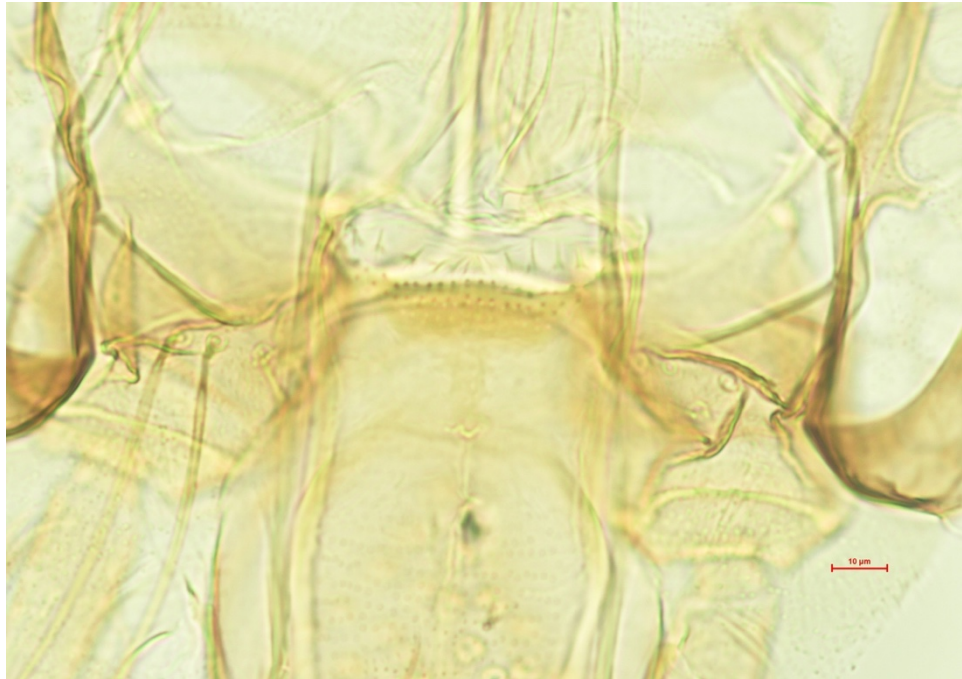
Túi chứa tinh của *Se. hivernus* chụp ở vật kính x40



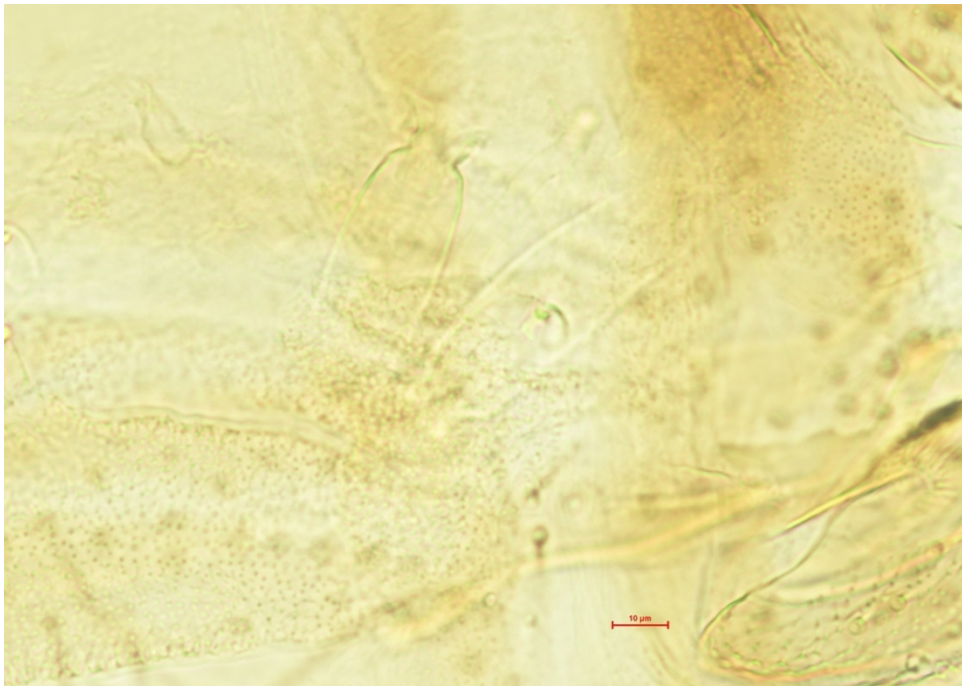
Hàm của *Se. khawi* chụp ở vật kính x40



Túi chứa tinh của *Se. khawi* chụp ở vật kính x40



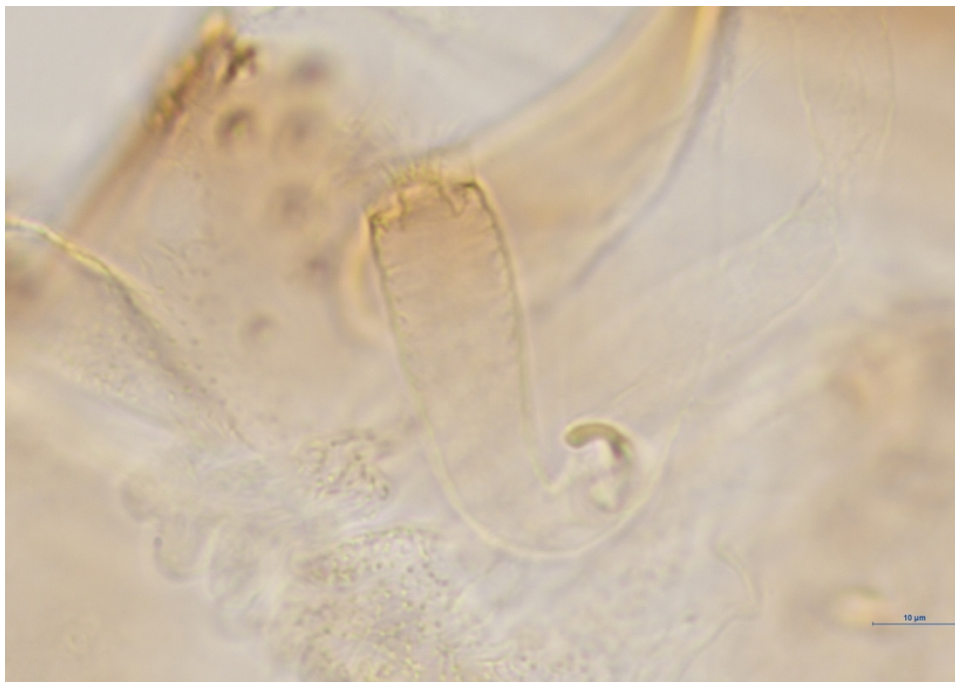
Hàm của *Se.pertuban* chụp ở vật kính x40



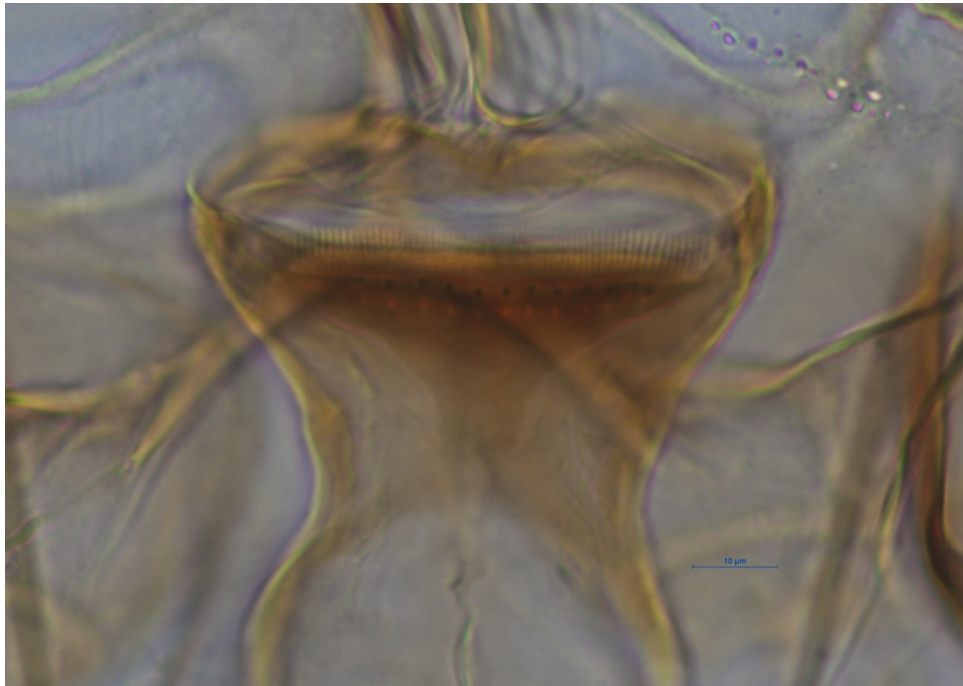
Túi chứa tinh của *Se.pertuban* chụp ở vật kính x40



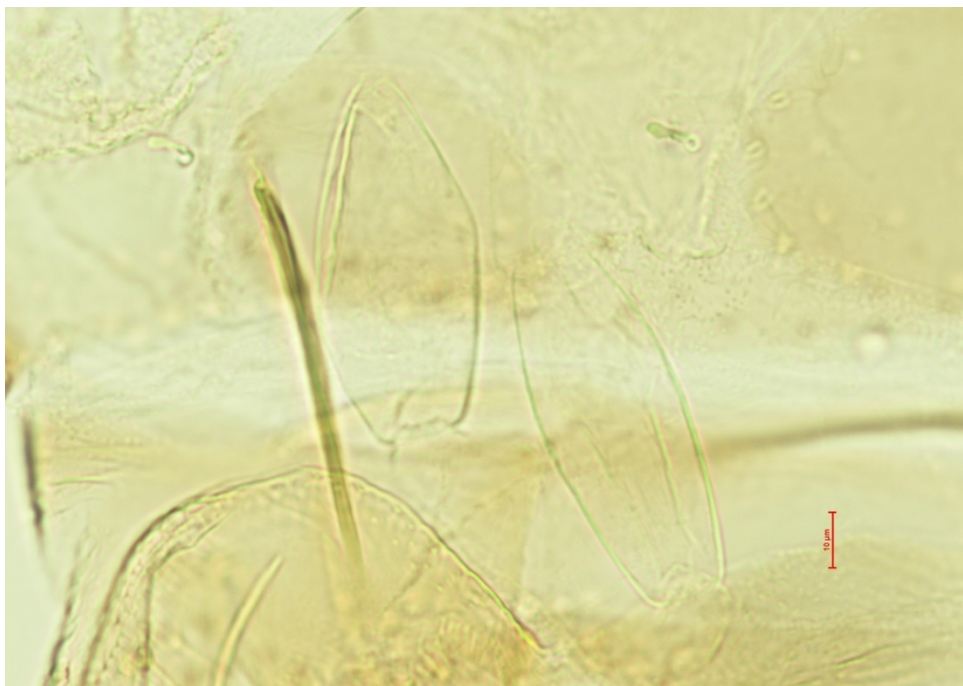
Hàm của *Se.2* chụp ở vật kính x40



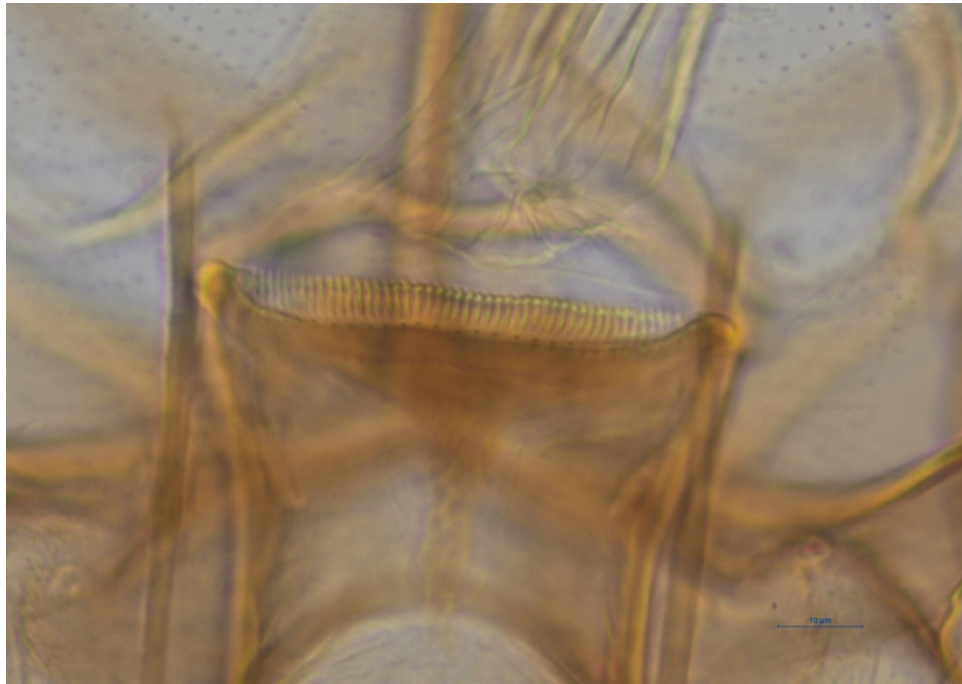
Túi chứa tinh của *Se.2* chụp ở vật kính x40



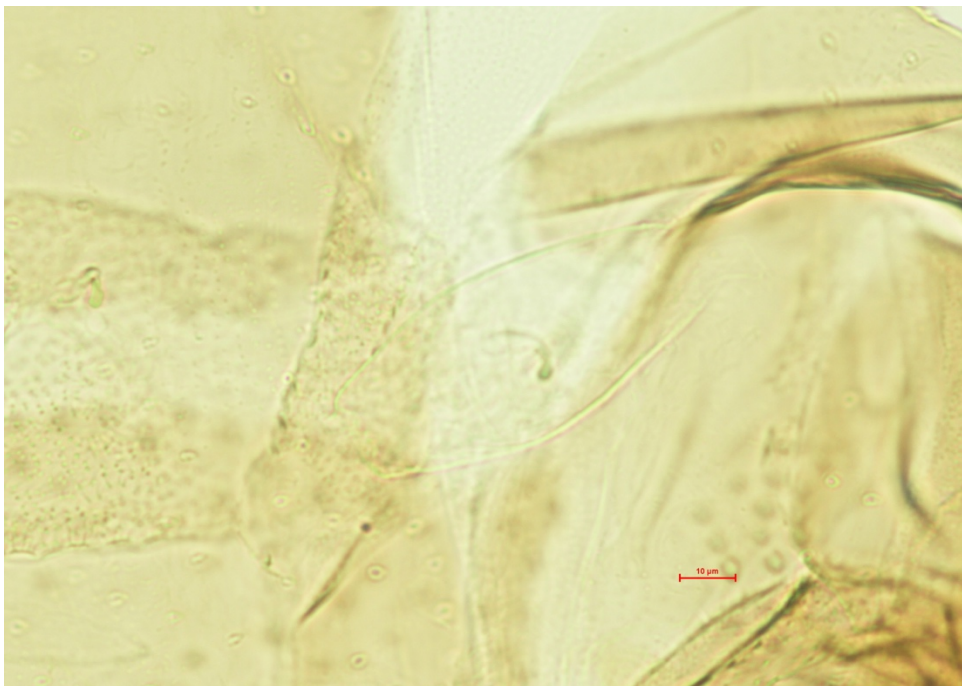
Hàm của *Se. barraudi* chụp ở vật kính x60



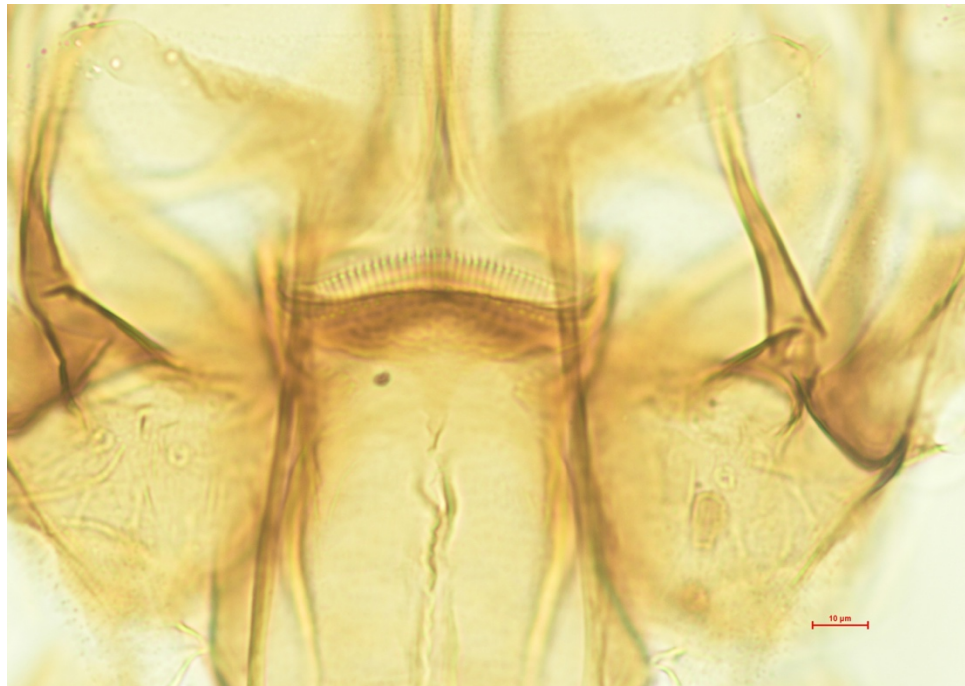
Túi chứa tinh của *Se. barraudi* chụp ở vật kính x40



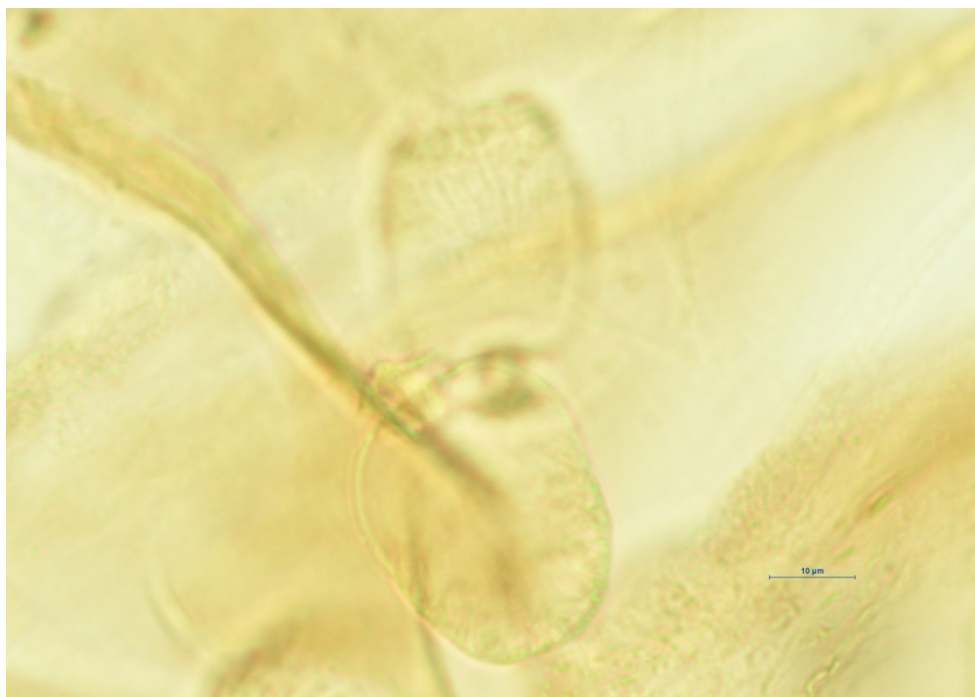
Hàm của *Se. brevicaulis* chụp ở vật kính x60



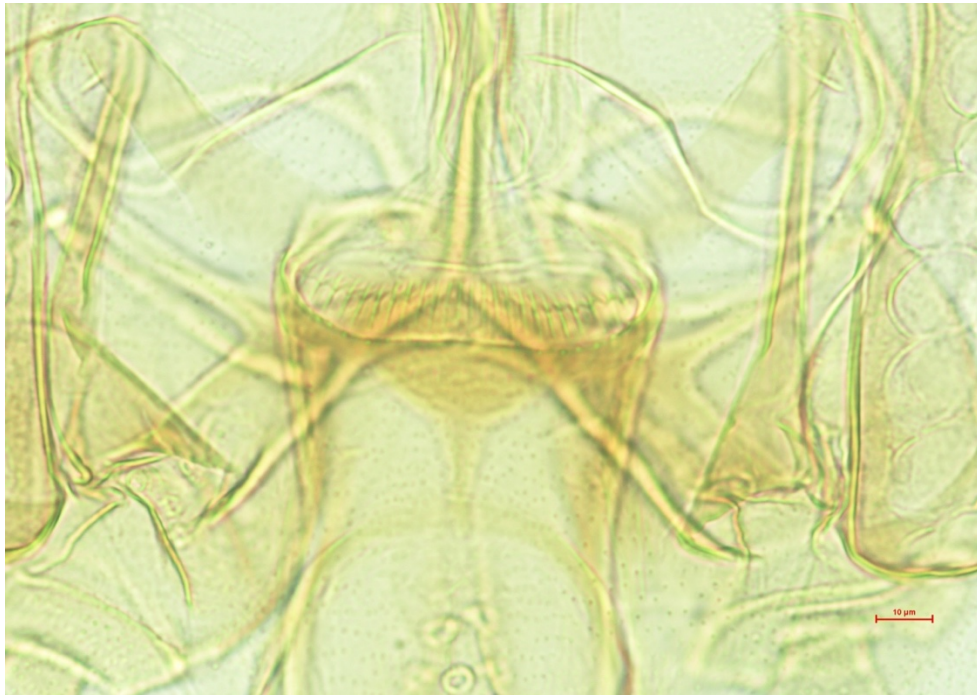
Túi chứa tinh của *Se. brevicaulis* chụp ở vật kính x40



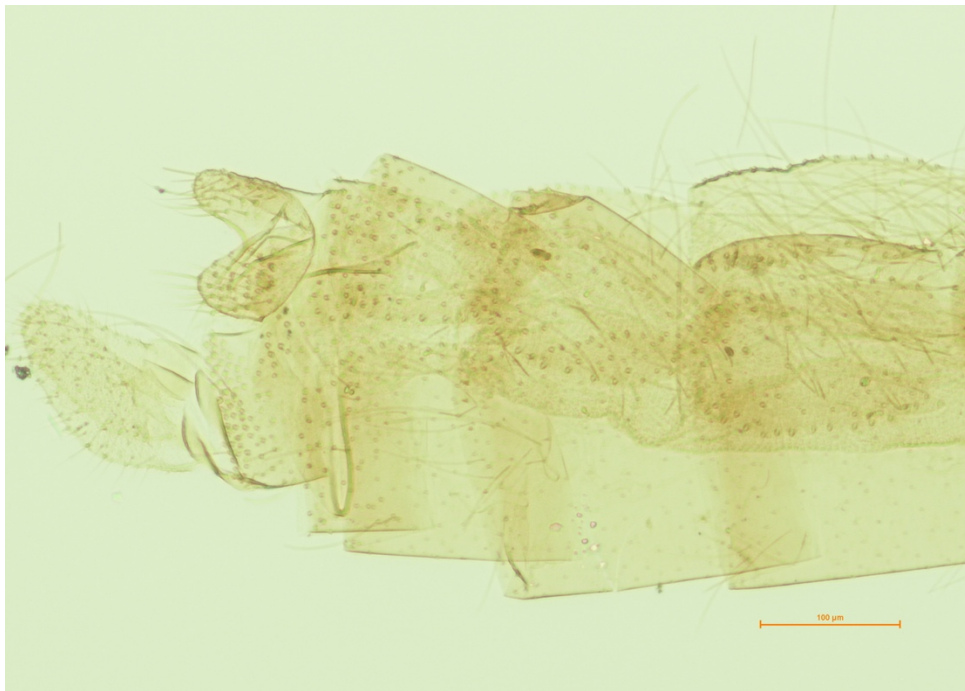
Hàm của *Gr. indica* chụp ở vật kính x40



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