BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**

VIỆN SỐT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

----------*----------

ĐOÀN THUÝ HOÀ

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ, THÀNH PHẦN LOÀI SÁN LÁ GAN NHỎ, SÁN LÁ RUỘT NHỎ TẠI 2 HUYỆN KIM SƠN VÀ YÊN KHÁNH, TỈNH NINH BÌNH (2016-2019)

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

HÀ NỘI - 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
VIỆN SỐT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

----------*----------

ĐOÀN THUÝ HOÀ

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ, THÀNH PHẦN LOÀI SÁN LÁ GAN NHỎ, SÁN LÁ RUỘT NHỎ TẠI 2 HUYỆN KIM SƠN VÀ YÊN KHÁNH, TỈNH NINH BÌNH (2016-2019)

Chuyên ngành: Dịch tễ học

Mã số: 972 01 17

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Lê Trần Anh

2. PGS.TS. Lê Thị Hồng Hanh

HÀ NỘI - 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Đoàn Thúy Hòa, nghiên cứu sinh khóa 9, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, chuyên ngành Dịch tễ học

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn trực tiếp của PGS.TS Lê Trần Anh, Học viện Quân y và PGS.TS Lê Thị Hồng Hanh, Bệnh Viện Nhi Trung ương. Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã đề nghị và được được chủ nhiệm đề tài và các cộng sự cho phép sử dụng mẫu và một phần số liệu của đề tài cấp tỉnh: *"Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh sán lá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống"*. Các số liệu và kết quả trong luận án là hoàn toàn trung thực, chưa được công bố ở bất kỳ công trình nào khác. Các bước tiến hành của đề tài đúng như đề cương nghiên cứu, chấp hành các quy định đạo đức trong tiến hành nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những cam kết này.

Hà Nội, ngày 20 tháng 5 năm 2020

Tác giả

Đoàn Thúy Hòa

LỜI CẢM ƠN

Với lòng chân thành, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Lê Trần Anh, PGS. TS. Lê Thị Hồng Hanh đã hướng dẫn và giúp đỡ tận tình trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS. TS. Trần Thanh Dương - Viện trưởng và đặc biệt xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Cao Bá Lợi cùng toàn thể cán bộ của Phòng Khoa học - Đào tạo Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi nhiệt tình trong thời gian nghiên cứu, học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm TS. Đỗ Trung Dũng – Trưởng khoa Ký sinh trùng Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương; TS. Hoàng Xuân Sử - Trưởng phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, TS. Đỗ Ngọc Ánh và đồng nghiệp bộ môn Ký sinh trùng và côn trùng Học viện quân y về sự giúp đỡ chuyên môn trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến Ban Lãnh đạo, cán bộ của sở khoa học công nghệ Tỉnh Ninh Bình và Trung tâm Y tế dự phòng tỉnh Ninh Bình, cán bộ y tế tại Trung tâm y tế huyện Kim sơn, huyện Yên Khánh, Trạm Y tế của các điểm nghiên cứu và nhân dân tại địa bàn nghiên cứu đã hợp tác cung cấp thông tin, bệnh phẩm, tạo điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu tại thực địa.

Xin chân thành cảm ơn Đại tá. BS. Trần Công Tuấn - Giám đốc Bệnh viện Công An Hà Nội, các đồng chí, đồng đội tại các Khoa phòng Bệnh Viện Công An Hà Nội và toàn thể bạn bè, đồng nghiệp đã động viên, khuyến khích và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình tôi đã luôn khuyến khích, chia sẻ, động viên, giúp đỡ tôi trong những lúc khó khăn để hoàn thành luận án này.

Hà Nội, ngày 20 tháng 5 năm 2020

Tác giả

Đoàn Thúy Hòa

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ĐTNC	: Đối tượng nghiên cứu
EPG (Eggs per gram)	: Số trứng trung bình trong 1 gam phân
FZT (fish-borne zoonotic trematode)	: Sán lá lây truyền qua cá
KAP (Knowledge Attitudes and Practices)	: Kiến thức, Thái độ và Thực hành KHV
OR	: Tỷ suất chênh
PCR	: Phản ứng chuỗi trùng hợp – Phản ứng
TB	: Trung bình
THCS	: Trung học cơ sở
THPT	: Trung học phổ thông
TTGDSK	: Truyền thông giáo dục sức khoẻ
TYT	: Trạm Y tế
SD (Standard Deviation)	: Độ lệch chuẩn
SLN	: Sán lá nhỏ
SLGN	: Sán lá gan nhỏ
SLRN	: Sán lá ruột nhỏ
XN	: Xét nghiệm
WHO (World Health Organization)	: Tổ chức Y tế Thế giới

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT iii
MỤC LỤC iv
DANH MỤC BẢNG vi
DANH MỤC HÌNH viii
ĐẶT VẤN ĐỀ 1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU 3
1.1. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ 3
1.1.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ 3
1.1.2. Sinh học và vòng đời 5
1.1.3. Phân bố sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ 11
1.1.4. Các yếu tố liên quan và biện pháp phòng chống sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ. 20
1.2. Kỹ thuật định danh và nghiên cứu thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ 27
1.2.1. Các kỹ thuật định danh 27
1.2.2. Nghiên cứu xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở Việt Nam 33
1.3. Một số nét về địa điểm nghiên cứu 36
Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 38
2.1. Xác định một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016 38
2.1.1. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người 38
2.1.2. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên cá 44
2.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử. 49
2.2.1. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người bằng phương pháp hình thái. 49

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 62
3.1. Xác định một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016..... 62
3.1.1. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người..... 62
3.1.2. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá..... 78
3.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử. 81
3.2.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người 81
3.2.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá..... 91
Chương 4. BÀN LUẬN 96
4.1. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016. 96
4.1.1. Đặc điểm dịch tễ học nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người 96
4.1.2. Đặc điểm dịch tễ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá..... 110
4.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử. 113
4.2.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người 113
4.2.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá..... 118
KẾT LUẬN..... 122
KIẾN NGHỊ 124
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN..... 125
CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ..... 126
MỘT SỐ HÌNH ẢNH NHÓM NGHIÊN CỨU THỰC HIỆN ĐỀ TÀI..... 127
TÀI LIỆU THAM KHẢO..... 130
PHỤ LỤC 149

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1. 1: Phân loại sán lá ruột nhỏ....4
Bảng 1. 2: So sánh kích thước trứng sán thu thập được ở người [48]....28
Bảng 2. 1: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR....57
Bảng 3. 1: Đặc điểm nghề nghiệp, học vấn của đối tượng nghiên cứu....63
Bảng 3. 2: Đặc điểm về điều kiện sống của đối tượng nghiên cứu (n=400)....64
Bảng 3. 3: Tỉ lệ hiểu biết về hành vi liên quan nhiễm sán lá nhỏ (n=400)....64
Bảng 3. 4: Tỷ lệ đối tượng nghiên cứu đã được truyền thông sán lá nhỏ....65
Bảng 3. 5: Tỉ lệ tuổi, giới biết ăn gỏi cá sẽ nhiễm sán lá nhỏ....65
Bảng 3. 6: Tỉ lệ người biết ăn cá chín có thể phòng nhiễm sán nhỏ....66
Bảng 3. 7: Tỉ lệ về người có kiến thức biết giới nào dễ nhiễm sán lá nhỏ....66
Bảng 3. 8: Tỉ lệ hiểu biết các tác hại của sán lá nhỏ (n=400)....67
Bảng 3. 9: Kiến thức của người biết về không dùng phân nuôi cá có thể phòng nhiễm sán lá nhỏ....67
Bảng 3. 10: Thái độ người dân với bệnh sán lá nhỏ....68
Bảng 3. 11: Tỷ lệ người dân có ăn gỏi cá tại địa điểm nghiên cứu....68
Bảng 3. 12: Tỷ lệ người dân có ăn gỏi cá theo nhóm tuổi, giới (n=400)....69
Bảng 3. 13: Lý do và địa điểm ăn gỏi cá....69
Bảng 3. 14: Tần suất ăn gỏi cá theo giới....70
Bảng 3. 15: Đặc điểm một số hành vi của đối tượng nghiên cứu (n=400)....70
Bảng 3. 16: Tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của đối tượng nghiên cứu....71
Bảng 3. 17: Tỉ lệ nhiễm sán lá nhỏ ở người theo nhóm tuổi....71
Bảng 3. 18: Tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ ở người theo giới....72
Bảng 3. 19: Tỷ lệ nhiễm lá nhỏ ở người theo nghề nghiệp (n=400)....72
Bảng 3. 20: Tỷ lệ nhiễm lá nhỏ ở người theo trình độ học vấn (n=400)....72
Bảng 3. 21: Cường độ nhiễm sán lá nhỏ ở đối tượng nghiên cứu....73
Bảng 3. 22: Cường độ nhiễm sán lá nhỏ theo giới (n=78)....73
Bảng 3. 23: Cường độ nhiễm trung bình theo nhóm tuổi (n=78)....74
Bảng 3. 24: Cường độ nhiễm trung bình theo nghề nghiệp (n=78)....74

Bảng 3. 25: Cường độ nhiễm trung bình theo trình độ học vấn (n=400) 74
Bảng 3. 26: Liên quan giữa ăn gỏi cá với nhiễm sán lá nhỏ 75
Bảng 3. 27: Liên quan giữa tần suất ăn gỏi cá với nhiễm sán lá nhỏ 75
Bảng 3. 28: Liên quan giới và tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ 76
Bảng 3. 29: Liên quan giới, ăn gỏi cá và nhiễm sán lá nhỏ.....76
Bảng 3. 30: Liên quan giữa nếp sống vệ sinh với nhiễm sán 77
Bảng 3. 31: Liên quan giữa nuôi chó, mèo với nhiễm sán 77
Bảng 3. 32: Liên quan giữa điều kiện sống với nhiễm sán 78
Bảng 3. 33: Loại cá thường được người dân sử dụng ăn gỏi 78
Bảng 3. 34: Nguồn gốc cá dùng để ăn gỏi 79
Bảng 3. 35: Kích thước cá thu được tại địa điểm nghiên cứu 79
Bảng 3. 36: Tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán trên cá 80
Bảng 3. 37: Cường độ nhiễm nang ấu trùng sán trong cá nước ngọt 80
Bảng 3. 38: Kích thước trung bình trứng sán lá nhỏ trong phân 81
Bảng 3. 39: Kích thước trung bình sán lá gan nhỏ trưởng thành trong phân (n = 36) 83
Bảng 3. 40: Một số chuỗi gen ITS 2đã được đăng ký trên ngân hàng gen.....85
Bảng 3. 41: Mức độ tương đồng mẫu 115 với một số chuỗi gen 89
Bảng 3. 42: Một số chuỗi gen ấu trùng sán đã đăng ký trên ngân hàng gen 92
Bảng 3. 43: Thành phần, số lượng nang ấu trùng phát hiện được trên 1 cá 94
Bảng 3. 44: Tỷ lệ nhiễm từng loại nang ấu trùng trên cá nước ngọt 94
Bảngn3.45: Cường độ nhiễm nang ấu trùng từng loại sán trong cá (nang ấu trùng/gam cá) 95

DANH MỤC HÌNH

Hình 1. 1: Hình thể cấu tạo sán lá gan nhỏ trưởng thành Clonorchis sinensis 5
Hình 1. 2: Hình thể sán lá gan nhỏ trưởng thành [1] và trứng 6
Hình 1. 3: Metacercariae *Opisthorchis felineus* [23] 6
Hình 1. 4: Vòng đời của sán lá gan nhỏ Clonorchis sinensis 7
Hình 1. 5: Sán lá ruột nhỏ trưởng thành (Hideto Kino) [3].....9
Hình 1. 6: SLRN trưởng thành nhiễm trên người tại Việt Nam [32] 9
Hình 1. 7: Trứng sán lá ruột nhỏ Prosthodendrium molenkampi.....10
Hình 1. 8: Vòng đời chung của các loài sán lá ruột nhỏ [8].....11
Hình 2. 1: Địa điểm nghiên cứu tại Ninh Bình 39
Hình 3. 1: Đặc điểm tuổi đối tượng nghiên cứu.....62
Hình 3. 2: Phân bố giới đối tượng nghiên cứu 63
Hình 3. 3: Hình ảnh trứng sán lá nhỏ trong phân.....81
Hình 3. 4: Hình ảnh sán trưởng thành.....82
Hình 3. 5: Hình ảnh giác miệng và giác bụng sán lá gan nhỏ trưởng thành.....83
Hình 3. 6: Hình ảnh tinh hoàn của sán trưởng thành.....84
Hình 3. 7: Tỷ lệ mẫu phân cho sản phẩm PCR (n=70) 84
Hình 3. 8: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trong mẫu phân 85
Hình 3. 9: Cây phả hệ trứng sán lá nhỏ ở người dựa vào ITS2.....86
Hình 3. 10: Hình ảnh chuỗi gen cox1 của mẫu 115 87
Hình 3. 11: Kết quả so sánh CoxI mẫu 115 với chuỗi EU652407 trên ngân hàng gen.....88
Hình 3. 12: Cây phả hệ trứng sán lá nhỏ ở người dựa vào CoxI.....90
Hình 3. 13: Nang ấu trùng sán lá ruột nhỏ ở cá.....91
Hình 3. 14: Hình ảnh sản phẩm PCR trong nang ấu trùng sán.....92
Hình 3. 15: Cây phả hệ nang ấu trùng SLGN, SLRN dựa vào ITS2.....93

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sán lá gan nhỏ (SLGN), sán lá ruột nhỏ (SLRN) là hai loài sán lá nhỏ (SLN) lây truyền qua cá (fish-borne zoonotic trematode) quan trọng gây bệnh ở người, hiện tại vẫn còn là vấn đề sức khỏe cộng đồng [1]. Ước tính có hơn một tỷ người có nguy cơ bị nhiễm sán lá do thực phẩm và khoảng 50 - 60 triệu người đã bị nhiễm bệnh sán lá [2]. Tuy nhiên thì con số này được cho là thấp hơn so với số người nhiễm bệnh thực sự vì vấn đề chẩn đoán và khó phát hiện và trường hợp bệnh giai đoạn sớm [3].

Các loại sán lá nhỏ lây truyền qua cá rất đa dạng về các loài và có thể được phân chia thành sán lá gan, sán phổi và sán lá ruột [3], [4]. Phân bố các loài này khắp thế giới nhưng khu vực lưu hành chính nằm ở Đông Nam, Châu Á và vùng Viễn Đông. Nơi có tỷ lệ lưu hành cao là Trung Quốc, Ấn Độ, Indonesia, Hàn Quốc, Malaysia, Philippines hoặc Thái Lan, Lào… [5]. Hiện nay trên thế giới có khoảng 45 triệu người nhiễm sán lá gan nhỏ, trong đó Châu Á có ít nhất 35 triệu người mắc [6]. Sán lá ruột nhỏ có khoảng 7 triệu người nhiễm [3] và cũng có tỉ lệ nhiễm song hành với sán lá gan nhỏ do tính chất lây truyền và dịch tễ tương đối giống nhau [7].

Mặc dù có nhiều đặc điểm sinh học giống nhau tuy nhiên sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ cũng có những khác biệt về vật chủ, thời gian hoàn thành vòng đời hay đáp ứng với thuốc điều trị. Trong những năm gần đây, các yếu tố như dòng di chuyển, tăng du lịch xuyên các quốc gia, các chính sách thương mại hoá, nuôi trồng thuỷ hải sản, những thay đổi trong thói quen ăn uống và toàn cầu hóa thực phẩm thị trường đang mở rộng giới hạn địa lý và dân số trên toàn thế giới đã làm thay đổi yếu tố dịch tễ. Nhiều nghiên cứu đề cập đến vấn đề nhiễm phối hợp sán lá gan nhỏ và nhiều loài sán lá ruột nhỏ trên người, xong việc chẩn đoán phân biệt nhiễm các loại sán do sự giống nhau về hình thái của trứng trong phân (chỉ đơn thuần dựa trên phương pháp thông thường (Kato, Kato-Katz) thực tế là khó khăn hoặc không thể phân biệt trứng). Các kỹ thuật chẩn đoán phân tử tuy phát triển nhưng chúng vẫn còn hạn chế, điều này dẫn đến thiếu sót trong chẩn đoán sán lá ruột nhỏ mặc dù phân bố địa lý rộng, tỷ lệ mắc bệnh cao ở một số quốc gia trong khu vực lưu hành, [8], [9].

Tại Việt Nam theo Bộ Y tế (2016), có ít nhất 32 tỉnh có bệnh sán lá gan nhỏ *C. sinensis* và *O. viverrini* trong đó các tỉnh lưu hành nặng nhất là Nam Định, Ninh Bình, Hòa Bình, Hà Nội, Thanh Hóa, Phú Yên, Bình Định [10]. Chưa có báo cáo thống kê cụ thể về số người nhiễm sán lá ruột nhỏ nhưng đã phát hiện người nhiễm *H. pumilio, H. taichui, C. formosanus* và một số loài khác ở Đồng bằng sông Hồng [11], [12]. Nhiều nơi tỷ lệ tái nhiễm giun sán nói chung và sán lá nhỏ nói riêng khá cao nguyên nhân là người dân không bỏ được tập quán ăn gỏi cá [13], nhiều địa phương tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ lên tới trên 30% dân số [14]. Xong Thái độ điều trị và ý thức quan điểm của việc phòng chống chưa được thường xuyên và các dữ liệu về đặc điểm hình thái học và sinh học phân tử của sán lá ruột nhỏ trưởng thành tại Việt Nam còn thiếu hoặc chưa được nghiên cứu một cách đầy đủ. Việc chẩn đoán chính xác loài sán có ý nghĩa quan trọng trong thiết kế các chương trình phòng chống hiệu quả.

Ninh Bình có 2 huyện Kim Sơn, Yên Khánh là nơi người dân có thói quen ăn gỏi cá và có nhiều bệnh nhân nhiễm sán lá gan nhỏ. Những năm 2001–2002 đã có một số công bố về nhiễm sán lá gan nhỏ ở Kim Sơn cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh khá cao (trên 20%), có nhiều yếu tố nguy cơ nhiễm ở cộng đồng như thói quen ăn gỏi cá cao [15]. Tuy nhiên các nghiên cứu trước đây chủ yếu sử dụng kỹ thuật xét nghiệm phân, xác định loài bằng phương pháp hình thái để phát hiện tình trạng nhiễm sán mà chưa nhiều nghiên cứu xác định chính xác tỷ lệ nhiễm từng loài sán lá nhỏ trong một cộng đồng. Chính vì vậy các khảo sát dịch tễ học và phát hiện các bệnh nhiễm sán lá nhỏ ở người là cần thiết để hiểu rõ hơn về sự phân bố địa lý và tác động của từng loài đối với đời sống con người. Xuất phát từ những yêu cầu khoa học và thực tiễn trên đây, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài ***"Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ, thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và yên Khánh, tỉnh tỉnh Ninh Bình năm 2016-2019"*** với các mục tiêu sau:

1. Xác định một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016.

2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử tại điểm nghiên cứu.

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

Ngày nay, nhờ các kỹ thuật sinh học phân tử, phân loại sán lá có nhiều thay đổi, nhiều loài sán lá ruột mới được giám định và biết đến. Hơn 100 loài sán lá đã được ghi nhận gây nhiễm cho con người tập trung vào 6 nhóm chính gây bệnh tương ứng là: bệnh sán máng (schistosomiasis), bệnh sán lá gan lớn (fascioliasis), bệnh sán lá phổi (paragonimiasis), bệnh SLGN (opisthorchiasis, clonorchiasis), bệnh SLRN (intestinal trematodes) [9].

Trong luận án này chúng tôi tập trung nói tới một số loài sán lá lây truyền qua cá gồm SLGN, SLRN chủ yếu họ Opisthorchiidae và Heterophyidae.

1.1.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

1.1.1.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ

Vị trí phân loại sán lá gan nhỏ: [16]

Giới: Metazoa (Động vật - Kingdom Animalia);

Ngành: Platyhelminthes (Sán dẹt - Phylum Platyhelminthes);

Lớp: Trematoda (sán lá - Class Trematoda);

Phân lớp: Digena (Subclass digenea);

Bộ: Opisthorchiida (Order Opisthorchiida)

Họ: Opisthorchiidae;

Giống: *Clonorchis, Opisthorchis*;

Họ Opisthorchiidae gồm 3 loài lây nhiễm cho người gồm: *Clonorchis sinensis, Opisthorchis viverrini, Opisthorchis felineus* với đặc điểm sinh học, vòng đời và lâm sàng tương đối giống nhau [17].

O. felineus được Sebastiano Rivolta phát hiện trên mèo năm 1884, năm 1891 K.N. Vinogradov phát hiện trên người. *O. viverrini* được Leiper phát hiện lần đầu tiên năm 1911 trên các tù nhân ở Thái Lan, tuy nhiên ông nghĩ đây là *O. felineus*, đến năm 1955 Sadun EH cho rằng đó là một loài mới. *O. viverrini*, sau đó được Wykoff khẳng định lại năm 1965. *C. sinensis* do McConnel phát hiện lần đầu tiên ở Calcutta năm 1875 và được gọi là *Distomum spathulatum*, năm 1895 Blanchard đặt tên giống Opisthorchis và gọi sán này là *Distomum sinense*. Năm

1907 Looss đặt tên giống Clonorchis, sán Clonorchis có tinh hoàn chia nhánh khác với sán Opisthorchis có tinh hoàn chia thùy [18].

1.1.1.2. Thành phần loài sán lá ruột nhỏ

Bảng 1. 1: Phân loại sán lá ruột nhỏ

Bộ	Họ	Giống
Opisthorchiida	Heterophyidae	*Apophallus, Ascocotyle, Centrocestus, Cryptocotyle, Haplorchis, Heterophyes, Heterophyopsis, Metagonimus, Procerovum, Pygidiopsis, Stellantchasmus, Stictodora*
Plagiorchiida	Echinostomatidae	*Artyfechinostomum, Acanthoparyphium, Cathaemasia, Echinochasmus, Echinoparyphium, Echinostoma, Episthmium, Euparyphium, Himasthla, Hypoderaeum, Psilorchis*
	Lecithodendriidae	*Phaneropsolus, Prosthodendrium*
	Paramphistomatidae	*Fischoederius, Watsonius*
	Microphallidae	*Spelotrema*
	Nanophyetidae	*Nanophyetus*
	Plagiorchiidae	*Plagiorchis*
Strigeidida	Strigeidae	*Cotylurus*
Brachylaimoidea (trên họ)	Brachylaimidae	*Brachylaima*
Digenea incertae sedis (không thuộc đơn vị phân loại nào)	Gastrodiscidae	*Homalogaster*
	Gymnophallidae	*Gymnophalloides*
	Neodiplostomidae	*Neodiplostomum*

Nguồn(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi)

SLRN gồm khoảng 70 loài thuộc nhiều bộ khác nhau trong dưới lớp Digenea, có nhiều đặc điểm về hình thái và sinh học, cách lây nhiễm tương tự như

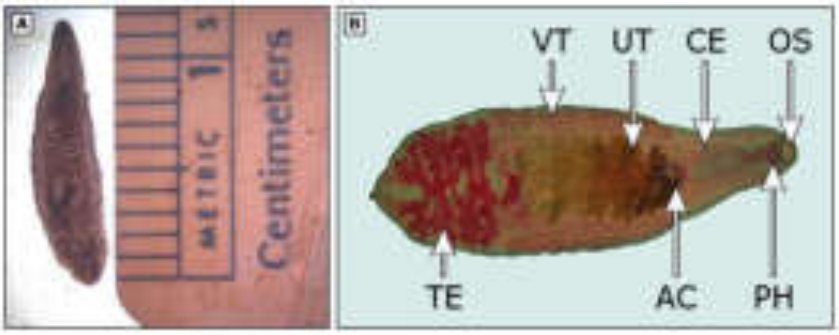
SLGN nên vùng phân bố của chúng có thể trùng với SLGN. Các biện pháp chẩn đoán hình thái rất khó khăn trong việc phân biệt SLGN và SLRN cho nên trong nhiều trường hợp nhiễm SLRN chưa được xác định chính xác và bị cộng dồn vào SLGN.

Trong số các loài SLRN thì Heterophyidae và Echinostomatidae là hai nhóm chính về số lượng loài có liên quan, số lượng người nhiễm, và sự phân bố các vùng lưu hành [19].

1.1.2. Sinh học và vòng đời

1.1.2.1. Sinh học và vòng đời sán lá gan nhỏ

- Hình thể sán lá gan nhỏ: [20]



Hình 1. 1: Hình thể cấu tạo sán lá gan nhỏ trưởng thành Clonorchis sinensis

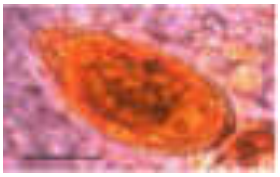
(A) Sán trưởng thành C. sinensis. (B) Sán trưởng thành C. sinensis nhuộm màu với carmine. (OS) mút miệng, (PH) hầu họng, (CE) ruột, (AC) hấp khẩu bụng, (UT) tử cung, (VT) tuyến noãn hoàng và (TE) tinh hoàn.

SLGN là sán lá lưỡng tính, sán trưởng thành có hình phẳng, thon dài, hình lá hoặc dẹt, kích thước phụ thuộc vào loài liên quan. *O. viverrini* là nhỏ nhất, kích thước 5,5-10×0,77-1,65mm. *O. felineus* có kích thước lớn hơn 7-12×2-3mm, trung bình dài 5,5-10mm và rộng 0,8-1,6mm. *C. sinensis* trưởng thành kích thước lớn nhất 10-25×3-5mm trung bình dài 8-15mm, rộng 1,5-4mm [21].

Sán có 2 giác bám, giác bụng thường nhỏ hơn giác miệng. Hai tinh hoàn nằm ở phía sau chia nhiều múi hoặc chia nhiều nhánh nhỏ. Tử cung nhỏ xếp khúc nằm ở giữa thân, hoàng thể hai bên. Ổ trứng hình bầu dục, nhỏ, dưới ổ trứng là túi tinh, sau tinh hoàn là ống bài tiết [7]. *C. sinensis* có hình thái tương tự như *O. viverrini* và *O. felineus*, nhưng khác biệt ở tinh hoàn phân nhánh [21].

- Trứng sán lá gan nhỏ: *C. sinensis*, *O. felineus* và *O. viverrini* có hình thái tương tự khiến chúng khó phân biệt với nhau. Trứng hình bầu dục, dài khoảng 19-35µm và rộng khoảng 10-20µm. Trứng có một lớp vỏ mỏng bắt màu màu vàng nhạt. Một đầu trứng có nắp, hai gờ của nắp nổi rõ. Đuôi trứng có núm con nhỏ gọi là gai. Các gai của mỗi loài là khác nhau. Bề mặt của vỏ trứng thô và không đều đã được mô tả trên kính hiển vi [22].

A, *Opishorchis felineus*
B, *Opithorchis vivverini*
C, *Clonorchis sinensis*



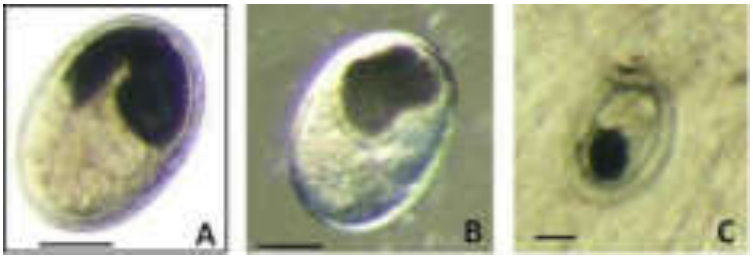
O. felineus [23]

O. viverrini [24]

C. Sinensis [25]

Hình 1. 2: Hình thể sán lá gan nhỏ trưởng thành [1] **và trứng**

- Ấu trùng sán lá gan nhỏ:

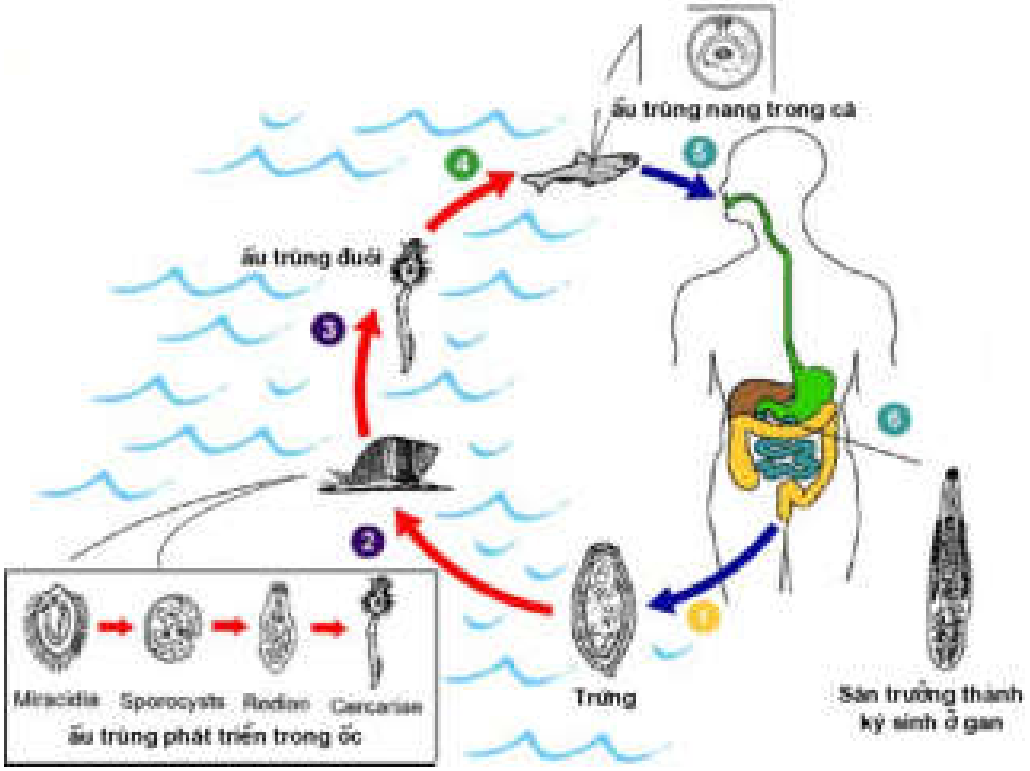


Hình 1. 3: Metacercariae *Opisthorchis felineus* [23]

Giai đoạn ấu trùng truyền qua cá cho người và các động vật có vú khác được gọi là metacercaria, nó được bao bọc trong các mô khác nhau của vật chủ (tôm, cá). Metacercaria *C. sinensis* có hình tròn, bầu dục, kích thước 0,13-0,14 x 0,09-0,10mm [26]. Metacercaria *O. viverrini* có hình tròn, bầu dục, kích thước

0,19-0,25x0,15-0,22m [22]. Metacercaria *O. felineus* có hình bầu dục, kích thước 0,25-0,30x0,19-0,23mm [1].

- Vòng đời sán lá gan nhỏ: Vòng đời SLGN phức tạp, qua nhiều vật chủ. Sán ký sinh ở đường mật trong vật chủ chính (người, chó, mèo…) đẻ trứng, trứng theo phân ra ngoại cảnh. Trứng rơi vào nước, ốc (vật chủ phụ một) nuốt trứng, trứng phát triển thành ấu trùng lông (miracidia) và phát triển qua nhiều giai đoạn (sporocysts, rediae) rồi thành ấu trùng đuôi (cercariae) rời khỏi ốc sống tự do trong nước. Ấu trùng đuôi xâm nhập vào cá (vật chủ phụ 2) phát triển thành thành nang ấu trùng (metacercariae). Vật chủ chính ăn cá nhiễm nang ấu trùng, ấu trùng thoát nang trong tá tràng và đi lên đường mật, phát triển thành sán trưởng thành có khả năng đẻ trứng sau 3-4 tuần. Hạn định đời sống của SLGN có thể dài tới 25 năm [1], [21] [27].



Hình 1. 4: Vòng đời của sán lá gan nhỏ Clonorchis sinensis

Vật chủ chính sán *C. sinensis* gồm người và một số động vật có vú như chó, mèo, lợn, chuột (*Rattus norvegicus*), một số động vật ăn cá hoang dã, có thể cả chim tuy nhiên người được coi là vật dự trữ mầm bệnh quan trọng nhất [21].

Vật chủ phụ một SLGN có nhiều loài ốc khác nhau tùy địa điểm nghiên cứu. Nghiên cứu tại Thái Lan cho thấy vật chủ phụ một của sán *O. viverrini* là các loại ốc *Bithynia siamensis, B. goniomphalos* và *B. funiculata*. Vật chủ phụ một của *C. Sinensis* là ốc nước ngọt thuộc 5 họ (*Assimineidae, Bithyniidae, Hydrobiidae, Melaniidae, Thiaridae*) như *Alocinma, Bulimus, Melanoides, Parafossarulus* (đặc biệt là *P. manchouricus*) và *Semisulcospira* [21]. Ốc giải phóng rất nhiều ấu trùng đuôi, một ốc nhiễm *O. viverrini* có thể giải phóng 1728 ấu trùng đuôi/ngày. Trái ngược với tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng cao ở cá tỷ lệ nhiễm ấu trùng đuôi ở ốc thấp (khoảng 1%) do đó việc làm giảm tỷ lệ nhiễm ở ốc rất khó khăn, ít khả thi và hiệu quả thấp trên thực tế [28].

Vật chủ phụ hai của SLGN gồm nhiều loài cá nước ngọt, chủ yếu là cá họ Cyprinidae và một số họ khác [21]. Tỷ lệ nhiễm ở cá thường rất cao 60-95%, cường độ nhiễm cũng có thể rất cao, số lượng nang ấu trùng ở cá thay đổi từ một vài đến hàng trăm, có những loài nhiễm tới 30.000 nang ấu trùng/cá và trên 6.000/gam cá như *P. parva* ở Trung Quốc, Hàn Quốc [29]. Tình trạng nhiễm nang ấu trùng phụ thuộc nhiều yếu tố như loài cá, bộ phận cơ thể khác nhau ở cá, nguồn nước nơi cá sống, mùa vụ... [30].

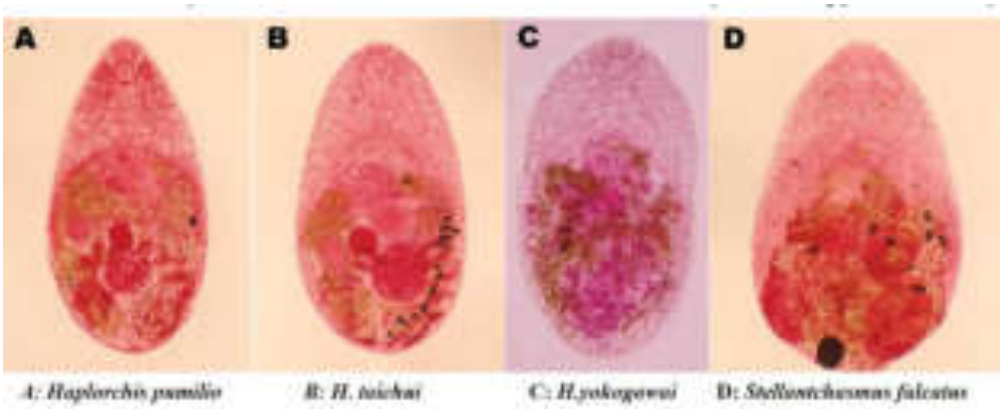
Do vòng đời của SLGN liên quan tới hai vật chủ trung gian nên đặc điểm dịch tễ học cũng liên quan tới hai vật chủ trung gian này trong đó vật chủ phụ một (ốc) có vai trò quyết định đến phân bố của sán do chỉ một số ít ốc có thể nhiễm sán. Vai trò của vật chủ phụ hai ít quan trọng hơn do rất nhiều loài cá có thể mang ấu trùng sán. Sự phân bố của sán phụ thuộc vào ốc tuy nhiên lây nhiễm vào người và động vật ăn thịt phụ thuộc vào cá. Vật dự trữ mầm bệnh gồm người, chó, mèo, lợn, chuột và nhiều loại động vật ăn cá khác. Sán lây truyền chủ yếu do ăn cá sống hoặc chưa nấu chín nên tỷ lệ nhiễm cao ở những cộng đồng có thói quen ăn cá sống. Tập quán làm nhà vệ sinh trên ao hồ, nuôi cá bằng phân người là những yếu tố góp phần quan trọng trong lan truyền bệnh. Tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* cao ở động vật có vú bao gồm chó, mèo (tỉ lệ lây nhiễm 0,8-4,8,5%) do đó kiểm soát nhiễm sán ở động vật cũng đóng vai trò trong phòng chống nhiễm sán ở người [21], [31].

1.1.2.2. Sinh học và vòng đời sán lá ruột nhỏ

- Hình thể sán lá ruột nhỏ: Heterophyidae có chiều dài từ 0,5-2mm, chiều rộng từ 0,3-0,4mm. Phía ngoài cơ thể thường có nhiều gai. Chúng có 1 giác miệng và một giác bụng. Xung quanh giác miệng có thể có hoặc không có gai. Giác miệng nhỏ nối liền với hầu, họng, hệ thống ruột có cấu tạo đơn giản và kết thúc là ruột tịt. Giác bụng lớn hơn và thường chứa khoảng 70 gai. Giác bụng và lỗ sinh dục thường không đi đôi với nhau. Hai tinh hoàn nằm ở phía sau cơ thể. Hai buồng trứng và tuyến hoàng thể nằm ở phía trước cơ thể [3]

Hình 1. 5: Sán lá ruột nhỏ trưởng thành (Hideto Kino) [3]

(a) *Heterophyes heterophyes* (1:50 µm); (b) *Metagonimus yokogawai* (1:150 µm)
(c) *Metagonimus miyatai* (1:75 µm); (d) *Haplorchis taichui*. (1: 100 µm)



Hình 1. 6: SLRN trưởng thành nhiễm trên người tại Việt Nam [32]

Hình thái Heterophyidae thay đổi phụ thuộc vào vật chủ ký sinh. Chiều dài, chiều rộng một số loài ở Việt Nam như sau: *H. pumilio* 632×291µm, *H. taichui* 756×421µm, *H. yokogawai* 760×400 µm, *S. falcatus* 468×298µm. Trên thực tế kích thước toàn thân của SLRN họ Heterophyidae rất nhỏ chỉ từ khoảng 350-1100µm chiều dài và 120-650 µm chiều ngang [33].

Metagonimus hình thái khác với Heterophes và Heterophyopsis. Metagonimus kích thước nhỏ hơn, giác bụng nằm gần giữa dưới bụng, không có bộ phận sinh dục, trong khi Heterophyes và Haplorchis kích thước lớn hơn, giác bụng nằm chính giữa và cơ quan sinh dục nổi lên [19]. Heterophyopsis thon dài không giống như Heterophyes [19]. Metagonimus có hai tinh hoàn nhưng Haplorchis và Procerovum chỉ có một tinh hoàn [34].

- Trứng sán lá ruột nhỏ: Hình ô van, màu vàng nhạt, bên trong chứa một tế bào phôi và nhiều tế bào noãn hoàng, có nắp mảnh ở một cực.

Metagonimus. yokogawai [25]
26-30 x 15-20 µm

Phaneropsolus. bonnie [35]
30 × 15 µm

Prosthodendrium. molenkampi [35]
24 × 12 µm

Hình 1. 7: Trứng sán lá ruột nhỏ Prosthodendrium molenkampi

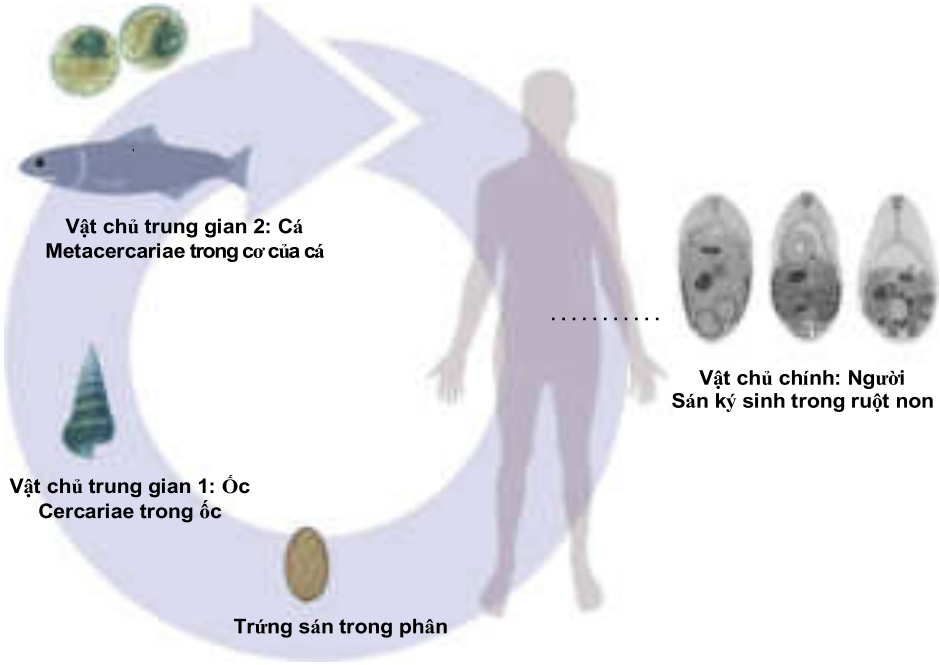
Trứng của *H. taichui* kích thước 0,027-0,032 x 0,014-0,017mm. Trứng *H. taichui* và *H. pumilio* gần giống nhau có hình ô van, vỏ dày nhẵn, có nắp nhô lên giống như có vai, có thể có mấu nhỏ ở phía dưới hoặc không, kích thước 25-28 x 2-15µm [36].

- Vòng đời sán lá ruột nhỏ: SLRN cũng lây truyền qua cá, vòng đời tương tự SLGN. Tuy nhiên vòng đời SLRN có một số điểm khác biệt.

Vật chủ chính: sán lá ruột nhỏ có thể ký sinh trên nhiều loại động vật có vú, chim.

Vật chủ phụ 1: thường là các loài ốc *Melanoides, Semisulcospira* [15].

Vật chủ phụ 2: ấu trùng SLRN xâm nhập và tạo nang ấu trùng trong cơ của nhiều loài cá nước ngọt, nước lợ hoặc tôm [3]. Khác với sán trưởng thành có thể nhiễm nhiều loại vật chủ, hầu hết nang ấu trùng Heterophyids có tính đặc hiệu cao với loài và thậm chí mô, cơ quan của vật chủ phụ.



Hình 1. 8: Vòng đời chung của các loài sán lá ruột nhỏ [8]

Thời gian hoàn thành vòng đời SLRN nhanh hơn SLGN. Người bị nhiễm bệnh khi ăn cá hoặc tôm chứa metacercariae sống, phát triển thành sán trưởng thành trong vòng 5-10 ngày. Sán trưởng thành bắt đầu đẻ trứng trong khoảng 9 ngày và chỉ sống một vài tháng đến dưới 1 năm [37].

1.1.3. Phân bố sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

1.1.3.1. Phân bố lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên thế giới

- Phân bố SLGN ở người trên thế giới: Có khoảng 680 triệu người trên toàn thế giới có nguy cơ bị nhiễm SLGN. Ước tính cho thấy 45 triệu người sống ở châu Á và châu Âu bị nhiễm bệnh, với khoảng 35 triệu nhiễm *C. sinensis*, 10 triệu nhiễm *O. viverrini* và 1,2 triệu trường hợp nhiễm *O. felineus* [39].

C. sinensis phân bố nhiều nơi ở châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, một vài ca bệnh đã được thông báo ở Malaysia, Singapore. *C. sinensis* là tác nhân gây bệnh nhiều nhất với khoảng 600 triệu người có nguy cơ trong đó có khoảng 570 triệu người sống ở Trung Quốc, bao gồm cả Đài Loan, vào Hàn Quốc và vùng viễn đông Nga [40].

O. viverrini phân bố chủ yếu dọc theo Hạ lưu sông Mê Kông và các nhánh của nó ở phía bắc và phía đông bắc Thái Lan, Lào, Campuchia và miền trung Việt Nam [41], [42]. *O. viverrini* hầu hết được báo cáo từ phía bắc và đông bắc của

Thái Lan, trong khu vực sông Mê Kông cũng có một phần lưu hành *O. viverrini* và ở các vùng khác của Thái Lan [43]. Khoảng 80 triệu người có nguy cơ nhiễm *O. viverinii*, riêng Thái Lan có khoảng 6 triệu người nhiễm *O. viverinii* [21].

O. felineus phân bố chủ yếu ở Nga, Đông Âu, khoảng 12,5 triệu người có nguy cơ nhiễm *O. felineus* [21]. Nó đã được báo cáo từ các quốc gia châu Âu trừ Phần Lan, Na Uy và Thụy Điển. Vật chủ là thú ăn thịt hoang dã và động vật dưới nước [44], nhưng con người có thể đóng một vai trò quan trọng trong truyền ký sinh trùng [6]. *O.felineus* phổ biến ở một số khu vực của Siberia và gây ảnh hưởng sức khỏe đáng kể cho cả người và động vật, có xu hướng tăng từ phía tây về phía đông [45].

- Phân bố SLGN ở cá trên trên thế giới: Vật chủ phụ 2 của *C. sinensis* chủ yếu là cá, bao gồm 132 loài với 11 họ, 46 giống, trong đó có 32 giống và 71 loài thuộc họ cá chép (*Cyprinidae*), ngoài ra còn một số loài giáp xác [45]. Phần lớn cá được nuôi trồng như cá chép (*Cyprinus carpio*), cá trắm cỏ (*Ctenopharyngodon idellus*), cá mè (*Hypophthalmichthys molitrix*), cá rô phi (*Oreochromis mossambicus*). Theo Lun (2005), có khoảng 60 loài cá không thuộc họ *Cyprinidae* có thể là vật chủ của *C. Sinensis*. Tỷ lệ nhiễm sán ở cá thường rất cao 60-95%. Có những loài nhiễm tỷ lệ rất cao như *Parabramis pekinensis* nhiễm *C. sinensis* là 80% và *Abbottina sinensis* 95% [45].

Zhang Y (2014) nghiên cứu cá nước ngọt tại Trung Quốc thấy 10/13 loài cá nước ngọt nhiễm metacercariae của *C. sinensis;* tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* là 19,96%, trong đó *P. parva* nhiễm cao nhất 42,57%, cá chép *C. carpio* 1,49%; tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* trên cá ở sông (31,96%) cao hơn ở hồ, ao (7,93) [46].

Tại Thái Lan, 15 loài các nước ngọt được xác định là vật chủ trung gian thứ 2 của *O. viverrini* [19]. Ở châu Âu, ấu trùng sán *O. felineus* đã được tìm thấy trong các loài cá *Alburnus alburnus, Abramis brama, A. ballerus, Blicca bjoerkna, Idus idus, Rutilus rutilus, Scardinius erythrophthalmus* và *Tinca tinca* với tỷ lệ nhiễm có thể tới 95% [23].

Một con cá có thể nhiễm hàng ngàn nang ấu trùng. Số lượng ấu trùng nhiễm trong cá thay đổi phụ thuộc vào mùa, loài cá và các chỉ số vật lý và sinh học của

nguồn nước [23], [19]. Tình trạng nhiễm nang ấu trùng ở cá phụ thuộc vào nhiều yếu tố: vị trí trên cơ thể cá (nang ấu trùng thường tập trung nhiều ở cơ thân, sau đó đến vây lưng, vây ngực, vây bụng), yếu tố mùa vụ [19]. Ấu trùng SLGN thường nhiễm nhiều nhất ở cá vào mùa xuân và mùa hạ. Sau đó là mùa thu và thấp nhất vào mùa đông (tháng 7 tháng 1) [47]. Đỉnh mật độ metacercaria của *C. sinensis*, *O. felineus*, và *O. viverrini* vào mùa xuân và mùa hè, mùa hè và mùa thu, và mùa đông. Số lượng các metacercariae mỗi cá khoảng từ một đến hàng trăm, nhưng đã phát hiện hơn 30.000 ký sinh trùng/một con cá với hơn 6.000 metacercariae/g [48].

Theo một số nghiên cứu, các loài cá có kích thước nhỏ như *P. parva* (cá nước ngọt có trọng lượng 0,5-1,5g) và *P. leiacanthus* có tỷ lệ nhiễm ấu trùng sán lá gan nhỏ tính trên 1 đơn vị khối lượng cao hơn so với các loài cá lớn [48]. Bởi vì, ở cá to ấu trùng sán phân tán trong cơ thể cá nên mật độ ấu trùng trên một đơn vị khối lượng thường thấp [49]. Tuy nhiên, các loài cá nhỏ ít được sử dụng để ăn sống nên tỷ lệ nhiễm ấu trùng ở cá nhỏ ít liên quan tới tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ ở người [50]. Vì vậy, nhiễm SLGN ở người thường do ăn cá nhiều lần và những người nhiễm nặng thường do ăn cá có nang ấu trùng còn sống trong một thời gian dài [19].

- Phân bố SLRN ở người trên thế giới: SLRN trước kia được coi là hiếm nhưng có thể rất phổ biến ở những vùng ăn cá sống. Do cùng lây truyền qua cá nên vùng phân bố có thể trùng với phân bố SLGN.

Tổng cộng có hơn 26 loài họ Heterophidae đã tìm thấy ký sinh trên người. Nhiều loài thuộc giống *Heterophyes, Haplorchis, Metagonimus, Carneophallus* có thể gây bệnh ở người: *H. heterophyes, M. yokogawai, H. taichui, H. pumilio* và *S. falcatus* là một vài Heterophyids ký sinh ở người.

Heterophyids chủ yếu được tìm thấy ở các nước châu Á (Nhật Bản, Hàn Quốc, Lào, Việt Nam, Thái Lan, Đài Loan, Philippines và Trung Quốc), Hawaii, Siberia, Thổ Nhĩ Kỳ và các nước vùng Balkans. Loài phổ biến nhất trong lưu vực sông Mê Kông là *H. taichui* [34].

H. heterophyes lần đầu tiên được phát hiện ở người Ai Cập và là một loài phổ biến đồng bằng sông Nile. Giai đoạn 1984-1991, tỷ lệ nhiễm bệnh của *H.*

Heterophyes phổ biến ở đồng bằng dao động từ 0,001-1% và dân số (ước tính là 933.000 người) có nguy cơ nhiễm. Ở các làng Khuzestan (Iran), tỷ lệ lưu hành ở người dao động từ 2 đến 24% [9]. Châu Á, là nơi được xác định là nhiễm nhiều nhất nhưng nó có thể bị nhầm lẫn với *Heterophes nocens* [51]. Ở Tây Âu, người nhiễm *H. heterophyes* đã được ghi nhận không thường xuyên.

M. yokogawai là SLRN phổ biến nhất lây nhiễm cho người ở Viễn Đông và phân bố ở Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, Indonesia. Hàn quốc, tỷ lệ nhiễm đạt 4,8%, trong các cộng đồng ven sông nơi thường ăn cá ngọt. Đặc biệt, phía đông của tỉnh Gyeongbuk, tỷ lệ nhiễm từ 20-70% [19].

Hàn Quốc có 10 loài Heterophyidae được ghi nhận, *H. nocens* thường lây nhiễm cho người tỷ lệ phổ biến từ 17-70% [52]. *M. miyatai*, *M. takahashi* cũng đã được thấy nhiễm ở người với từ Gun đến sông Namhan. *Pygidiopsis summa* phổ biến rộng rãi phân bố ở phía tây và tây nam khu vực ven biển của Hà Quốc. Gần đây, tỷ lệ nhiễm là 4,9% được mô tả ở tỉnh Nam Jeolla [38].

Các trường hợp lẻ tẻ khác được báo cáo *C. armatus* (1), *H. pumilio* (1), *H.continua* (10), *S. falcatus* (4), *Stictodora fuscata* (14), và *S. lari* (6) cũng được ghi nhận [53]. Hai trường hợp nhiễm của *H. dispar* đã được báo cáo ở những người đàn ông trở về từ Ả Rập [54]. Ở Tây Âu, người nhiễm *H. heterophyes* đã được ghi nhận không thường xuyên…

Số lượng báo cáo SLRN bên ngoài châu Á là rất hạn chế, chỉ có bốn loài thỉnh thoảng được ghi nhận. Nhiễm *I. melis* ở người đã được phát hiện vào năm 1916 ở một bệnh nhân tiêu chảy ở Rumania. Và *E. revolutum* đã được báo cáo ở Ai Cập và Nga [55]. *H. muehlensi* ban đầu được mô tả trên sán trưởng thành từ một bệnh nhân người Đức sống ở Colombia đã ăn nghêu sống khi đi du lịch tới New York. DeGirolami và Kimber (1983) đã phát hiện *Echinostoma sp* từ những người châu Á đến sống tại Hoa Kỳ. Poland (1985) báo cáo 18 trường hợp nhiễm Echinostomiasis trong tổng số 20 khách du lịch Mỹ đến Kenya, đây là báo cáo đầu tiên về nhiễm Echinostomiasis ở người ở Đông Phi [38], [56].

- Phân bố SLRN ở cá trên trên thế giới: Ấu trùng có thể xâm nhập và tạo thành nang ấu trùng trong cơ của nhiều loài cá nước ngọt, nước lợ hoặc tôm. Tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng trên cá khác nhau tùy loại cá.

Nghiên cứu trên cá *Plecoglossus altivelis* tại Hàn Quốc thấy tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng của *Metagonimus* từ 60,7-99,3%; mật độ 61-949 nang ấu trùng/cá tùy vùng [57]. Nghiên cứu SLRN *H. taichui* trên 207 cá nước ngọt (17 loài) mua ở chợ Luang Prabang, Lào thấy tỷ lệ nhiễm metacercariae *H. taichui* 138 (67%); mật độ trung bình 520/cá; tỷ lệ và mật độ nhiễm *H. yokogawai* (52% và 50/cá); *H. pumilio* (18% và 3/cá) thấp hơn [58]. Nghiên cứu sự liên quan giữa kích thước cá chép (*C. carpio*) với nhiễm SLRN (*Heterophyidae*) thấy tỷ lệ nhiễm ở cá nhỏ (1g), trung bình (25g) và cá lớn (45g) là 63%, 0,08 cá/cercariae; 20%, 0,004 cá/cercariae và 5%, 0,0007 cá/cercariae chứng tỏ việc tiếp xúc với cá nhỏ là một yếu tố nguy cơ quan trọng để truyền sán lây qua cá [59].

Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng cá đánh bắt hoang dã có một tỷ lệ và cường độ nhiễm nang ấu trùng *Haplorchis* cao hơn so với cá nuôi trong ao; tình trạng nhiễm còn phụ thuộc vào mật độ nuôi thả, mật độ thả cá cao thì cá nhiễm gần như ở cá hoang dã [60].

1.1.3.2. Phân bố sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở Việt Nam

- Phân bố SLGN trên người ở Việt Nam: Tại Việt Nam, *C. sinensis* được Grall phát hiện và thông báo ca sán đầu tiên vào năm 1887 ở miền Bắc. Năm 1909 (Mathis và Le'ger) đã tìm thấy *C. sinensis* trên một công dân Pháp ở Việt Nam. Sài Gòn đã thông báo có 291 người nhiễm *C. sinensis*, nhưng chủ yếu những người này có nguồn gốc từ miền Bắc di cư vào Nam. Đến năm 1965, Đặng Văn Ngữ và Đỗ Dương Thái phát hiện một trường hợp nhiễm *C. sinensis* phối hợp với *O. felineus* ở Việt Nam [61]**.**

Từ năm 1976-2002, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương đã xác định bệnh do loài *C. sinensis* lưu hành chủ yếu ở miền Bắc. Đã có ít nhất ở 12 tỉnh thành nhiễm bệnh, tỷ lệ nhiễm trung bình là 19% (Kiều Tùng Lâm và cộng sự, 1992). Có địa phương nhiễm tới 37% như tỉnh Nam Định, có nơi bệnh phân bố trên toàn tỉnh như tỉnh Hòa Bình (Nguyễn Văn Đề

và cộng sự, 1996, 1998, 2002, 2003) [61]. Kino và Nguyễn Văn Đề (1998) kiểm tra phân với kỹ thuật Kato-Katz cho thấy trong 306 cư dân được chọn ngẫu nhiên ở huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình, Việt Nam, 42 người (13,7%) bị nhiễm *C. sinensis*. Tỷ lệ này thiên về nam giới (23,4%) so với nữ giới (1,5%) và tăng theo tuổi. Không có trẻ em dưới 10 tuổi bị nhiễm bệnh, phản ánh sự khác biệt về cơ hội mắc bệnh thông qua thói quen ăn cá sống.

Đặng Thị Cẩm Thạch (2008) cho thấy Ở Việt Nam lưu hành hai loại sán là *C. sinensis* phân bố ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng và *O. viverrini* ở miền trung Việt Nam. Tỷ lệ nhiễm sán *C. sinensis* ở người từ 0,2-26% [15]. Nguyễn Văn Chương (2008) đã điều tra phát hiện loài *O. viverrini* tại 2 tỉnh: Phú Yên và Bình Định, với tỷ lệ nhiễm từ 3,92%-7,67% [49].

Doanh và Nawa (2016) đã đưa ra nhận xét rằng "Chẩn đoán trước đây của *C.sinensis* và *O.viverrini* ở Việt Nam có thể đã bị nhầm lẫn dẫn đến đánh giá về tỷ lệ hiện mắc của cả hai loài này quá cao" [62].

Tại Ninh Bình đã phát hiện được sự lưu hành của SLGN từ lâu. Huyện Kim Sơn, tỷ lệ nhiễm từ 18,5% (xã Đồng Hướng, 1994) đến 31,15% (Ân Hòa và Kim Định năm 1998), gần đây nhất là 22,5% (năm 2004). Cường độ nhiễm đa số ở mức trung bình 504-1384 trứng/gam phân; 33,64% bệnh nhân nhiễm ở mức trên 1000 trứng/g phân. Tỷ lệ ăn gỏi cá cao (67,9%); 87,5% người ăn gỏi cá là nam giới, cá thường sử dụng làm gỏi là cá mè [63].

- Phân bố SLGN trên cá ở Việt Nam: Kino và Nguyễn Văn Đề (1998) cho thấy Ốc sên, *Melanoides tuberculatus*, được thu thập từ các ao xung quanh huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình, Việt Nam đã bị nhiễm cercariae với tỷ lệ 13,3%. Cá nuôi (*Hypophthalmichtys molitrix*) trong ao bị nhiễm metacercariae với tỷ lệ 56,4% ở cá thể nhỏ và 100% ở những con lớn [64].

Nguyễn Văn Đề (2001) nghiên cứu "*Đánh giá thực trạng bệnh sán lá gan Clonorchiasis tại vùng châu thổ sông Hồng*" phát hiện vật chủ phụ 2 của SLGN *C. sinensis* gồm 8 loài cá: cá mè (*H. molitrix*) 56,4 – 100%; cá trôi (*Mylopharyngodon piceus*) 10%; cá rô (*Anabas testudineus*) 80%; cá rô phi (*Tilapia mossambica*) (1/1), cá trắm (*Cirrhina molitorella*), diếc (*Carassius*

carassius), mương (*Rasborinus lineatus*) 12 – 60,6%. Lê Văn Châu (2001) phát hiện vật chủ phụ 2 của SLGN *C. sinensis* gồm 8 loài cá: cá mè (*H. molitrix*) 56,4-100%; cá trôi (*Mylopharyngodon piceus*) 10%; cá rô (*Anabas testudineus*) 80%; cá rô phi (*Tilapia mossambica*) (1/1), cá trắm (*Cirrhina molitorella*), diếc (*Carassius carassius*), mương (*Rasborinus lineatus*) 12-60,6% [65].

Bùi Ngọc Thanh (2014) tại Gia Viễn, tỉnh Ninh Bình cho thấy, tỷ lệ và cường độ nhiễm trùng *C.sinensis* ở cá 13 mương là 21,95% và 0,98 ấu trùng/cá, ở cá thiểu là 43,75% và 0,42 ấu trùng/cá [66]. Tại Vĩnh Long, Đặng Thúy Bình (2014) ghi nhận tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng *C. sinensis* ở cá tra, cá thu là 14,89% [67]. Ấu trùng sán lá gan nhỏ *C. sinensis* cũng được tìm thấy ở chép giống, cá mè và nhiều loại cá khác [68].

- Phân bố SLRN ở Việt Nam trên người: Theo thông báo của Nguyễn Văn Đề, từ năm 2004-2006, đã xác định SLRN lưu hành ít nhất tại 18 tỉnh, gồm: Yên Bái, Phú Thọ, Điện Biên, Lào Cai, Bắc Kạn, Quảng Ninh, Bắc Giang, Hà Nội, Hà Tây (cũ), Nam Định, Ninh Bình, Thanh Hoá, Hải Phòng, Thái Bình, Nghệ An, Thừa Thiên Huế, Lâm Đồng và An Giang [69].

Năm 2006, tại Việt Nam đã thông báo một số loài SLRN gây bệnh trên người ở Việt Nam bao gồm: *H. pumilio*, *H. taichui*, *H. yokogawai*, *S. falcatus*, *Procerovum sp*. và *Echinostoma spp*. Các loài sán này được tìm thấy ở các tỉnh Hà Tây, Nam Định, Yên Bái, Thanh Hóa, Lâm Đồng và Thừa Thiên Huế với tỷ lệ nhiễm dựa trên kết quả xét nghiệm phân từ 0,2% đến 6,6% nhiễm SLRN, đặc biệt *H. pumilio* được tìm thấy ở hầu hết tại các địa phương trên [70].

Một nghiên cứu khác tại Nghệ An, Nam Định và An Giang cho thấy tỷ lệ nhiễm FZT lần lượt tại các tỉnh là 0,06%, 64,9% và 0,29%. Tại một xã miền núi thuộc tỉnh Phú Thọ một điều tra cho thấy tỉ lệ nhiễm SLGN là 16,4%, nhiễm SLRN 4,3% [66].

Nghiên cứu tại 2 xã thuộc huyện Nghĩa Hưng, tỉnh Nam Định nơi người dân có truyền thống ăn gỏi cá, tỉ lệ nhiễm chung với SLN lên tới 64,9%, tỉ lệ nhiễm nam giới là 68,7% và nữ giới là 23,1%. Các loài SLN được xác định bằng hình thái học tìm thấy tại nghiên cứu này *H. pumilio*, *H. taichui*, *H. yokogawai, S.*

falcatus [2]. Năm 2007, một điều tra về tình hình nhiễm SLN tại Nam Định thấy 37% nam giới nhiễm SLN, trong khi đó ở nữ là 25,7% [45].

- Phân bố SLRN trên cá ở Việt Nam: Nguyễn Văn Đề và cộng sự (2004) Nghiên cứu ở Nam Định và Ninh Bình thấy 34,6% cá ở Nam Định nhiễm SLGN, SLRN; nhiều loài cá (cá mè, trôi, trắm, chép, diếc, rô, rô phi…) nhiễm nang ấu trùng SLGN và SLRN trong đó cá mè có tỷ lệ và cường độ nhiễm cao nhất (44,5%) [63].

Xét nghiệm một số loài cá chợ Hà Nội (2006) thấy cá diếc (*C. carassius*) nhiễm 21,7%, cá trắm (*Mylopharyngodon piceus*) nhiễm 13,3%, cá trê (*Clarius fuscus*) 6,7%, cá chép (*C. carpio*) 3,3%, cá chuối (*Ophicephalus maculatus*) 3,3%, rô phi (*T. mossambica*) 1,7%, cá trôi (*Cirrhinamolitorella*) 1,7%, cá mè (*H. molitrix*) và cá chày (*Squaliobabus curriculus*) không thấy nhiễm [70].

Nguyễn Thị Hợp (2007) nghiên cứu 1.200 cá từ nuôi trồng thủy sản hệ thống tiếp nhận nước thải từ các thành phố Hà Nội và Nam Định thấy tỷ lệ cá nhiễm sán tổng thể là 5% (2,0% vào mùa thu và 6,5% vào mùa xuân). Các loài cá bị nhiễm bệnh bao gồm cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) và ba loài cá chép, bao gồm cá mè (*Hypophthalmichthys molitrix*), thường được sử dụng để chế biến các món cá sống. Các metacercariae thu được đều là sán lá thuộc họ Heterophyidae, cường độ nhiễm trùng tương đối thấp [71].

Trần Thị Kim Chi (2008) điều tra trong cá nuôi của hộ gia đình nông thôn ở tỉnh ở Nghệ An thấy tỷ lệ nhiễm sán trên cá là 44,6% dao động từ 12,5%-61,0% từ các ao nuôi; Tỷ lệ nhiễm chung là 43,6% ở cá giống được nuôi trong các vườn ươm, dao động từ 7,4%-62,8% đối với các loài cá khác nhau. Phát hiện các loài sán nhiễm ở cá là: *H. pumilio*, *H. taichui*, *H. yokogawai*, *C. formosanus, S. Falcatus, E. japonicus.* Đây là báo cáo đầu tiên của *H. yokogawai* và *E. japonicus* ở cá ở Việt Nam, và là báo cáo đầu tiên về *S. falcatus* ở miền bắc Việt Nam [72].

Một nghiên cứu dọc từ 6/2006 - 5/2007 tại Nam Định. Tổng cộng có 3820 con cá được lấy mẫu 6 lần trong khoảng thời gian hai tháng từ trang trại cá nghiên cứu. Kết quả phát hiện được nang ấu trùng các SLGN *C. sinensis* và SLRN *H. Pumilio, Haplochis, H. taichui, H. yokogawai, Formosanus Centrocestus và*

Procerovum varium trong mẫu cá; tỷ lệ nhiễm SLN trên cá chung là 72% [32].

Phan Thị Vân (2010) nghiên cứu trên 1543 con cá tại Nam Định phát hiện nang ấu trùng của *C. sinensis; H. pumilio* (82,7%) [50]. *H. pumilio* rất phổ biến và được tìm thấy ở hơn 50% cá không phân biệt nguồn gốc. Không có sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm sán trong cá nuôi (64,3%), cá hoang dã (68,9%), cũng như cá nuôi giữa các loài (65,1%) và loài thu được từ ao tự nhiên (58,1%). Mật độ của metacercariae trong cá từ kênh (0,56 metacercariae/g) cao hơn đáng kể ($p < 0,001$) so với cá từ ao (0,03 metacercariae/g) [73]. Một nghiên cứu khác trên các trại cá giống tại Bắc Ninh, Nam Định, Ninh Bình không phát hiện cá bột từ trại giống nhiễm sán. Trong vườn ươm, tỷ lệ nhiễm sán ở cá con là 14,1%, 48,6% và 57,8% sau 1 tuần, 4 tuần và khi được đan xen trong ao, tương ứng. Tỷ lệ nhiễm sán cao hơn ở cá trắm cỏ ($p < 0,001$) so với các loài cá chép khác. Các loài sán được tìm thấy là: *C.sinensis, H. pumilio, C. formosanus*, *H. taichui* [74].

Jong-Yil Chai (2010) điều tra 9 loài cá nước ngọt thu thập từ các chợ Hà Nội (n=76), Nam Định (n=79) phát hiện 3 loại (*H. pumilio, F. Centrocestus, P. varium*) và 6 loại (*H. taichui, H. pumilio, C. formosanus, P. varium, S. falcatus, H. continua*) trong cá ở 2 khu vực tương ứng. Metacercariae *H. pumilio* được phát hiện ở 104/130 (80,0%) cá được kiểm tra, mật độ metacercarial trên mỗi cá bị nhiễm 64,2. Metacercariae *C. formosanus* được tìm thấy ở 37/92 (40,2%) cá kiểm tra, mật độ metacercarial 14,7. Metacercariae *P. varium* được phát hiện ở 19/30 (63,3%) cá, mật độ metacercarial 247,7. Metacercariae *S. falcatus* đã được tìm thấy trong tất cả 10 loài. Metacercariae *M. cephalus* được kiểm tra mật độ metacercarial 84,4. Hai metacercariae *H. continua* được phát hiện trong 1 con cá *Coilia lindmani*. Kết quả đã chứng minh rằng các loài FBT khác nhau phổ biến ở các vùng phía bắc của Việt Nam [58].

Nghiên cứu can thiệp (2012), tổng cộng có 9.266 cá con trong năm 2009 và 5.911 trong năm 2010 từ ao/hồ ươm cá tại Nam Định, Thái Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa kiểm tra metacercariae phát hiện được nang ấu trùng SLGN *C. sinensis* và SLRN *C. formosanus* , *H. Pumilio, H. Yokogawai* (Trong số các metacercariae được phục hồi, 94,00% thuộc họ Heterophyidae, 0,05% là *C. sinensis* và 5,95%

không thể xác định được [75].

Trần Văn Quyên và cộng (2012) sự xét nghiệm cá 5 huyện thuộc 3 tỉnh Hà Nội, Hải Dương, Nam Định. Bằng phương pháp ép cơ xác định có 7 loài cá nhiễm ấu trùng của SLGN, trong đó cá mè nhiễm cao nhất 53,33% và ấu trùng phân bố cao nhất là ở cơ 72,05%. Cường độ nhiễm ấu trùng cao nhất ở cá mè là 45,5 ấu trùng/con; diếc 44%; rô 26,66%; chép 24%; trắm 14,66%; rô phi 10,66%; cá trôi nhiễm 8% [76].

Kim Văn Vạn (2013) nghiên cứu trên cá chép giống ở khu vực phía Bắc (Bắc Ninh, Hà Nội, Hưng Yên, Hải Dương) phát hiện tỷ lệ nhiễm trung bình 23,89%; phát hiện được ba loài SLRN (*C. formosanus*, *H. pumilio*, *H. taichui*) và SLGN *C. Sinensis* [77].

Madsen và cộng sự (2015) nghiên cứu tại Nghĩa Hưng, Nam Định năm 2015, thu thập trên 200.000 metacercariae nhưng không phát hiện được nang ấu trùng của *C. sinensis*, phát hiện được nang ấu trùng của các loài SLRN như *H. pumilio*, còn lại là *H. taichui, H. yokogawai, C. formosanus, Procerovum* sp. [1].

Pham Ngọc Doanh và Yukifumi Nawa (2016) trong dự án FIBOZOPA (2004-2012) cho rằng nhiễm sán ruột ở cá như *H. pumilio* và *H. Taichui* phổ biến hơn nhiều so với nhiễm *C. sinensis* hoặc *O. Viverrini*. Nghiên cứu tìm thấy nang ấu trùng của nhiều loài SLRN (*H. pumilio, H. taichui, H. yokogawai, C. formosanus, S. falcatus, P. varium* và *E. japonicus*) [62].

1.1.4. Các yếu tố liên quan và biện pháp phòng chống sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ.

1.1.4.1. Các yếu tố liên quan

Yếu tố nguy cơ lớn nhất của nhiễm SLGN, SLRN là ăn gỏi cá, ăn cá nấu chưa chín. Có nhiều yếu tố liên quan đến hành vi này.

- Tuổi: Nói chung nhiễm sán lây truyền qua cá thường gặp ở người lớn, với tỷ lệ và cường độ nhiễm tăng theo tuổi [36]. Nhóm tuổi 0-5 có tỷ lệ thấp nhất, sau độ tuổi này, tỷ lệ nhiễm có xu hướng tăng lên và thường nhiễm cao ở độ tuổi 15-19. Ở một số nơi, tỷ lệ nhiễm tăng theo tuổi nhưng có xu hướng giảm tình trạng nhiễm giảm sau tuổi 50-60, tuy nhiên cũng có nơi tuổi 70 cũng có tỷ lệ dương tính

cao, có lẽ vì điều trị không thành công [78]. Lý do là tình trạng đáp ứng miễn dịch xuất hiện muộn dẫn tới tỷ lệ sống sót của SLGN trong đường dẫn mật ít hơn, tỷ lệ chết của sán cao hơn và nhóm người nhiều tuổi có xu hướng giảm tiếp xúc với nguy cơ nhiễm sán. Đa số trường hợp nhiễm trên 15 tuổi nhưng cũng có trường hợp trẻ em dưới 15 tuổi cũng nhiễm phản ánh hành vi, người lớn thường ăn cá sống và uống rượu nhiều hơn trẻ em [26]. Nhiễm SLGN ở trẻ em có thể do các bà mẹ cho con mình ăn cá sống [21]. Đa số các nghiên cứu cho thấy tuổi ảnh hưởng tỷ lệ nhiễm nhưng cũng có nghiên cứu thấy không khác biệt về tỷ lệ nhiễm giữa các nhóm tuổi [79].

- Giới: Đa số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ và cường độ nhiễm ở nam cao hơn nữ. Tại Việt Nam đa số các kết quả đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm SLGN, SLRN ở nam giới cao hơn so với nữ giới [45].

Nghiên cứu của Kino H và cộng sự (1998) cho thấy tỷ lệ nhiễm SLN ở nam là 23,4%; nữ là 1,5%. Nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy tỷ lệ nhiễm sán ở nam giới là 35,5%, cao hơn so với nữ giới (16,7%), nam giới có nguy cơ nhiễm cao hơn 2,63 lần so với nữ giới ($p<0,001$). Đặng Thị Cẩm Thạch và cộng sự thấy tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* ở nam giới cao hơn có ý nghĩa thống kê so với ở nữ giới (33,8% và 11%), cường độ nhiễm trứng ở nam giới cũng cao hơn so với ở nữ giới (EPG = 461,32 ở nam so với 138,19 ở nữ, $p<0,001$) [19], [80]. Nguyễn Văn Chương và cộng sự (2006) tại 4 tỉnh miền Trung thấy tỷ lệ nhiễm SLGN *O. viverrini* ở nam giới là 22,05%, cao hơn so với ở nữ (4,48%) [81].

- Kiến thức: Nghiên cứu tại Trung Quốc thấy kiến thức phòng chống có liên quan đến tình trạng nhiễm SLGN, SLRN [82]. Nhiều tác giả khuyến cáo sự cần thiết của nâng cao nhận thức của người dân [83] .

Nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy có mối liên quan giữa kiến thức, thái độ, thực hành sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh với tình trạng nhiễm SLGN [83]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Chương và cộng sự kết hợp điều trị đặc hiệu, can thiệp truyền thông giáo dục đã làm tăng hiểu biết của người dân về SLGN tại xã can thiệp tỷ lệ nhiễm sán *O. viverrini* giảm 74,1%; cường độ nhiễm giảm 76,75% so với trước can thiệp [84].

- Thái độ: Mặc dù có thể phòng chống SLGN, SLRN đơn giản bằng cách chỉ ăn cá đã nấu chín, tuy nhiên rất khó khăn để hàng triệu người thay đổi thói quen ăn uống qua nhiều thế kỷ [85].

- Ăn gỏi cá: Tất cả các nghiên cứu về hành vi, thói quen, tập quán nuôi cá, ăn rau sống (thủy sinh) trên thế giới và Việt Nam đề thống nhất ăn gỏi cá là yếu tố nguy cơ nhiễm SLGN, SLRN [15], [86].

Một số công trình nghiên cứu tại Hàn Quốc, Trung Quốc… cũng thấy sự liên quan giữa ăn gỏi cá với nhiễm sán lá gan nhỏ nói riêng và sán truyền qua cá nói chung [78]. Tại Trung Quốc thấy ăn cá nước ngọt hoặc tôm sống nấu chưa chín là yếu tố nguy cơ chính truyền *C. sinensis* [87].

Một số nghiên cứu ở Việt Nam cũng cho thấy ăn gỏi cá là yếu tố nguy cơ nhiễm SLGN. Nghiên cứu tại Tân Thành và Yên Lộc, huyện Kim Sơn tỉnh Ninh Bình thấy tỷ lệ và cường độ nhiễm sán *C. sinensis* ở người ăn gỏi cá (44,6% và 497,17 EPG) cao hơn đáng kể so với người không ăn gỏi cá (3,3% và 33,64 EPG) [19]. Nam Định thấy người ăn gỏi cá có nguy cơ nhiễm SLN cao hơn 2,3 lần (p = 0,013) so với người không ăn gỏi cá [86]. Ăn gỏi cá là hoạt động mang tính cộng đồng cao, phụ thuộc khu vực, tuổi, giới. Hà Duy Ngọ, Tạ Huy Thịnh điều tra tại huyện Nghĩa Hưng tỉnh Nam Định, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình thấy tỷ lệ ăn gỏi cá ở người lớn (35,7%) cao hơn so với trẻ em (dưới 15 tuổi 5,3%); tỷ lệ nam giới ăn gỏi (88,1%) cao hơn nhiều so với tỷ lệ nữ giới ăn gỏi cá (11,9%) [88].

Một số yếu tố liên quan đến hành vi ăn gỏi cá như địa điểm, chủng loại cá… có ảnh hưởng đến nguy cơ nhiễm sán. Ăn cá ở nhà hàng được coi là có nguy cơ bị nhiễm sán lá gan nhỏ cao hơn do phần lớn gỏi cá được chế biến từ cá được nuôi trồng, đánh bắt tại địa phương [86].

- Điều kiện vệ sinh môi trường: Blanton R. (2007) nghiên cứu nhà có ao nuôi cá cũng được coi là yếu tố nguy cơ [89]. Những người sống gần nguồn nước ngọt tỷ lệ nhiễm cao hơn gấp 2,15 lần [47]. Chuồng lợn, nhà vệ sinh gần ao, hệ thống cống rãnh dẫn nước xuống ao, hồ làm cho ao hồ ô nhiễm phân. Việc sử dụng phân người và động vật tươi nuôi cá liên quan tới nhiễm sán [90]. Vật dự trữ mầm

bệnh của SLGN gồm người, chó, mèo, lợn, chuột và nhiều loại động vật ăn cá khác. Kiểm soát nhiễm sán ở động vật đóng vai trò phòng nhiễm ở người [91].

1.1.4.2. Sinh bệnh học, lâm sàng, chẩn đoán, điều trị nhiễm SLGN, SLRN

- Sinh bệnh học, lâm sàng, chẩn đoán SLGN

+ *Sinh bệnh học SLGN:* Nhiễm sán lá gan gây ra những thay đổi bệnh lý tại các ống dẫn mật và có thể ảnh hưởng đến cả gan và túi mật. Ở giai đoạn sớm của nhiễm với *O. viverrini* sẽ xảy ra phản ứng viêm cấp tính tại các ống dẫn mật trong gan, các mô liên kết. Nhiễm kéo dài sẽ trở thành mãn tính, xơ gan dẫn đến tăng nguy cơ phát triển ung thư gan [92].

+ ***Triệu chứng lâm sàng SLGN***: phụ thuộc vào số lượng sán nhiễm trong đường dẫn mật [19]. Nhiễm nhẹ (số lượng trứng < 1.000/g phân hoặc nhiễm dưới 100 sán trưởng thành) thường không có triệu chứng [93]. Những trường hợp nhiễm nặng biểu hiện lâm sàng thường rõ với các triệu chứng khác nhau [45].Tần suất gặp các biểu hiện cấp tính ở người nhiễm SLGN khoảng 10% [93]. Các triệu chứng cấp tính sốt, viêm gan, tăng bạch cầu ái toan thường gặp ở người nhiễm *O. felinius*, hiếm khi gặp ở người nhiễm *C. sinensis* và *O. viverrini* [93].

+ ***Chẩn đoán SLGN:*** Theo hướng dẫn tại Quyết định số 1450/2004/QĐ-BYT ngày 26 tháng 4 năm 2004 của Bộ trưởng Bộ Y tế, chẩn đoán nhiễm sán lá gan nhỏ ở người cần dựa vào các yếu tố như: Tiền sử ăn gỏi cá và sống trong vùng dịch tễ nhiễm sán, triệu chứng lâm sàng và xét nghiệm phân hoặc dịch tá tràng. Các kỹ thuật chẩn đoán nhiễm SLGN bao gồm tìm trứng trong phân, xét nghiệm miễn dịch và sinh học phân tử [45], [93].

+ ***Điều trị SLGN***: Praziquantel là thuốc có hiệu quả được lựa chọn trong điều trị. Liều điều trị thường dùng là 75mg/kg cân nặng chia 3 lần trong ngày, dùng trong 2 ngày [45], [93]. Praziquantel được xác định có hiệu quả điều trị khỏi cao tới 90-95% và không xảy ra tình trạng kháng thuốc và tái nhiễm [9]. Trong điều trị nhiễm *C. sinensis* ở người với liều 25mg/lần x 3 lần/ngày x 1 ngày, tỷ lệ khỏi là 85% và tỷ lệ giảm trứng trong phân là 99,7% trong điều trị *O.viverrini* với liều 40mg/kg thì tỷ lệ khỏi là 90% và tỷ lệ giảm trứng > 99,7%; điều trị *O.felineus*

với liều 25mg/lần x 3 lần/ngày x 1 ngày tỷ lệ khỏi là 90% và tỷ lệ giảm trứng là 100% [21].

- Sinh bệnh học, lâm sàng, chẩn đoán SLRN

+ *Sinh bệnh học SLRN:* Sán trưởng thành ký sinh chủ yếu là ở tá tràng, trong nhiễm nặng có thể ký sinh ở nơi khác. Sán trưởng thành sống bám vào trong niêm mạc ruột gây teo, phì đại tuyến Lieberkhün, phì đại hạch bạch huyết mạc treo, và phản ứng viêm thâm nhiễm tế bào [94].

+ *Triệu chứng lâm sàng SLRN:* Thông thường, nhiễm SLRN là không có triệu chứng lâm sàng. Nhiễm nặng có các triệu chứng tiêu chảy, phân nhày, đau bụng, khó tiêu chán ăn, buồn nôn, và nôn [94]. Các triệu chứng thường giảm dần một cách tự nhiên sau 1 tháng dù sán có thể vẫn còn tồn tại đến hơn 1 năm, và tiêu chảy có thể tái phát từng đợt [95]. Đôi khi trứng sán có thể vào hệ thống tuần hoàn thông qua tuyến Lieberkuhn rồi di chuyển tới tim, thận, não, gan, lách gây biểu hiện ở các cơ quan này và điều này có thể gây tử vong cho bệnh nhân [68], [94], [95]. Gần đây, *H. taichui* đã được xác định như một tác nhân có thể gây hội chứng ruột kích thích [96].

+ *Chẩn đoán SLRN:* Triệu chứng chẩn đoán nhiễm SLRN thường thường không đặc hiệu chủ yếu dựa vào tìm trứng trong phân hoặc tìm thấy con trưởng thành trong phân [5]. Tuy nhiên, chẩn đoán nhiễm và xác định loài sán có thể gặp một số khó khăn bởi vì các loài SLRN có trứng khá giống nhau. Vì vậy, muốn xác định loài gây bệnh cần thu thập thêm sán trưởng thành [5]. Nhiều loài sán đẻ trứng với số lượng ít nên những trường hợp nhiễm nhẹ có thể khó tìm thấy trứng trong phân. Một số kỹ thuật sinh học phân tử cũng được nghiên cứu chẩn đoán nhiễm và xác định loài SLRN ký sinh ở người [97].

+ *Điều trị SLRN*: Praziquantel là thuốc có hiệu quả và được lựa chọn cho tất cả các loài sán Heterophyidae [19]. Liều điều trị được nhiều tác giả khuyến cáo là praziquantel 25mg/kg trong ngày, dùng 3 ngày hoặc 75mg/kg/ngày trong 1 ngày duy nhất [93]. Đối với sán M. yokogawai, điều trị liều duy nhất từ 10 đến 20mg/kg cân nặng có hiệu quả loại trừ sán tới 95-100% [19].

Các thuốc điều trị nhiễm sán Echinostomatidae có thể là mebendazol, albendazol, praziquantel hoặc niclosamide. Liều điều trị đơn của thuốc praziquantel đường uống được khuyến cáo là 10-20mg/kg cân nặng [19].

1.1.4.3. Biện pháp phòng chống

Theo khuyến cáo của WHO về kiểm soát sán lá truyền qua thực phẩm, các biện pháp bao gồm điều trị đặc hiệu, giáo dục sức khỏe, cải thiện điều kiện vệ sinh, và thực hiện các biện pháp an toàn thực phẩm.

- Giảm nguồn bệnh: Giảm nguồn bệnh dựa trên điều trị cho người và động vật bằng thuốc điều trị đặc hiệu. Nhiều cách thức điều trị: điều trị hàng loạt, điều trị cộng đồng chọn lọc, điều trị nhóm chọn, điều trị theo giai đoạn. Hóa trị liệu cộng đồng cần phải dựa vào các số liệu dịch tễ học [98]. Thuốc điều trị hiệu quả nhất là praziquantel [98]. Điều trị cộng đồng có khả năng giảm tỷ lệ nhiễm nhanh. Tuy nhiên khả năng tái nhiễm rất cao do đó các biện pháp phòng trong thời gian dài rất cần thiết. Việc sử dụng hóa trị liệu đơn thuần không loại trừ hoặc kiểm soát được các bệnh nhiễm trùng ở người; điều trị thuốc praziquantel đại trà chỉ đạt thành công khi kết hợp với cải tiến rộng rãi của hệ thống chăm sóc sức khỏe và sự phát triển kinh tế xã hội [79].

Theo quy định của Bộ Y tế năm 2016, việc điều trị được thực hiện với các đối tượng từ 6 tuổi trở lên tại các vùng sán lưu hành; 01 lần/năm với vùng có tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ trên 20%; 1 lần/2 năm với vùng có tỉ lệ nhiễm 10 – 20%; điều trị ca bệnh với vùng có tỷ lệ nhiễm dưới 10%.

- Cải thiện điều kiện vệ sinh môi trường: Việc cải thiện điều kiện vệ sinh môi trường tập trung vào quản lý và xử lý phân, ngăn chặn trứng tiếp xúc với các loại nguồn nước. Chiến lược sử dụng chất thải động vật (lợn, gia cầm) nuôi cá có tác dụng đáng kể trong cải thiện sức khỏe và điều kiện vệ sinh ở nhiều nước. Tầm quan trọng của giáo dục không ăn cá sống không cần nhấn quá mạnh nếu người tiêu dùng được bảo vệ khỏi các nguy cơ nhiễm trùng; kết hợp ngành nuôi trồng thủy sản tránh cho chuỗi thức ăn khỏi nhiễm nang ấu trùng [99]. Các biện pháp để ngăn chặn phân có chứa trứng nhiễm vào nước có ốc chỉ áp dụng được ở người,

không thể kiểm soát được ô nhiễm từ động vật và phương pháp này một mình sẽ không đủ hiệu quả.

- Giáo dục sức khỏe: Giáo dục cộng đồng tập trung vào phổ biến các kiến thức cơ bản về nhiễm trùng, biện pháp làm giảm nguy cơ nhiễm và cách thức để có thể nhận được điều trị; tăng cường hiểu biết, thúc đẩy các hành vi có lợi, hạn chế hành vi làm lây nhiễm sán. Tại Thái Lan chương trình loại trừ sán lá gan có sự kết hợp của điều trị đặc hiệu, giáo dục sức khỏe để thúc đẩy tiêu thụ cá nấu chín, cải thiện vệ sinh, đã làm giảm tỷ lệ nhiễm từ 63,6% năm 1987 xuống còn 9,4% năm 2001. Dự án kiểm soát ký sinh trùng thí điểm tại Lào bằng cách điều trị hàng năm với praziquantel trong 2 năm ít tác động lên khả năng truyền *O. viverrini*. Nếu không có biện pháp nâng cao kiến thức phòng bệnh thích hợp, tái nhiễm có thể xảy ra nhanh chóng [24]. Việc kiểm soát các bệnh lây truyền qua cá về lý thuyết là rất đơn giản, chỉ cần tránh ăn cá sống, nấu chưa chín. Tuy nhiên lại cực kỳ khó khăn vì thói quen truyền thống hàng trăm năm. Một nghiên cứu tại Nam Định cho thấy một số người có nhận thức về nguy cơ nhiễm sán do ăn cá sống; tuy nhiên, nhiều người chấp nhận những rủi ro và tiếp tục ăn cá sống vì biết thuốc điều trị hiệu quả có sẵn [86]. Như vậy, giáo dục sức khỏe cần phù hợp về văn hóa và từng cộng đồng [100].

- Bảo vệ người lành

+ Kiểm soát thực phẩm: Theo WHO cần thiết lập và phát triển hệ thống giám sát thực phẩm thường xuyên. Kiểm tra sự hiện diện của nang ấu trùng trong sản phẩm cuối cùng không hiệu quả bằng thực hành tốt trong an toàn thực phẩm [101]. Việc kiểm tra lấy mẫu sẽ không toàn diện. Kiểm soát vật chủ trung gian không phải là một lựa chọn thực tiễn vì ở nhiều nước cá nước ngọt là thực phẩm chủ yếu và có thể nhập khẩu từ nhiều nước khác [91].

+ Diệt nang ấu trùng trong cá: các biện pháp hiệu quả là nhiệt độ cao. Để diệt nang ấu trùng Clonorchiasis và Opisthorchiasis, cá nước ngọt cần được nấu chín cho đến nhiệt độ trong cá đạt 650C ít nhất 1 phút. Nhiệt độ thấp thường ít hiệu quả, cần nhiệt độ rất thấp trong thời gian dài. Hướng dẫn của Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm (FDA) là để cá ở -200C hoặc thấp hơn trong vòng 7

ngày hoặc ở -350C hoặc thấp hơn trong 15 h để cung cấp cá cho người ăn sống [17]. Chiếu xạ có hiệu quả diệt ấu trùng [60]. Ướp muối ít hiệu quả trong diệt nang ấu trùng, nhiều biện pháp chế biến cá như muối, để khô, hun khói, lên men, ướp nước mắm… không hiệu quả trong loại trừ nang ấu trùng sán lá truyền qua cá. Trong gỏi cá đã chế biến đưa vào sử dụng, nang ấu trùng (metacercaria) sán lá gan còn sống 93-95%. Các gia vị khác như mù tạt, tỏi, dấm, rượu vang đều không làm chết nang ấu trùng [102].

Nhìn chung mỗi biện pháp phòng chống đều có ưu nhược điểm khác nhau, cần phải kết hợp nhiều biện pháp khác nhau tùy thuộc đặc điểm dịch tễ để có hiệu quả cao nhất.

1.2. Kỹ thuật định danh và nghiên cứu thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

1.2.1. Các kỹ thuật định danh

1.2.1.1. Kỹ thuật định danh dựa vào hình thái

- Kỹ thuật định danh trứng sán

+ *Định danh dựa vào hình thái trong kính hiển vi quang học:* Trứng của SLGN, SLRN ví dụ Heterohyidae và Lecithodendriidae, có hình thái tương tự nhau. Chúng có thể cùng phân bố ở những khu vực người dân ăn gỏi cá do đó việc định danh sán là rất cần thiết để xác định chính xác sự lưu hành của từng loại sán. Trứng của *C. sinensis, O. felineus* và *O. viverrini* tương tự nhau về mặt hình thái với các vai rõ ràng bao quanh nắp ở một đầu và một núm nhỏ (gai, knob) hình dấu phẩy ở đầu bên kia, bề mặt vỏ trứng thường thô ráp, nhìn giống vỏ dưa [103]. Trứng của *C. sinensis* màu nâu vàng, kích thước 23–35µm, có nắp ở một đầu và một núm nhỏ phía bên kia. Trứng chứa ấu trùng lông (miracidium) [103]. Dưới kính hiển vi quang học, trứng của *O. viverrini* đặc trưng bởi vỏ trứng thô và dày; dưới kính hiển vi điện tử, thấy vỏ trứng hình vỏ dưa. Nhuộm bằng iod thấy trứng Lecithodendriids (*P. bonnei* và *P. Molenkampi*) có vỏ mịn và mỏng, trong có các thể ưa iod (iodophilic) trong khi đó trứng *O. viverrini* không có các thể này [89].

Tesana S và cộng sự (1991) nghiên cứu hình thái trứng *O. viverrini*, *H. taichui, H. pumilio, P. bonnei* và trứng *P. molenkampi*. Các tác giả thấy trứng *O.*

viverrini khác biệt SLRN là có vỏ trứng thô trong khi đó các loại khác có vỏ mịn. Trứng của *O. viverrini, H. taichui, H. pumilio* đều có vai rõ. Trứng Haplorchis tương đối giống nhau về hình thái nhưng trứng *H. pumilio* lớn hơn trứng *H. taichui, P. bonnie*, *P. molenkampi*. Trứng *P. bonnei* và *P. molenkampi* có vỏ mịn và vai không rõ, trứng *P. bonnei* mỏng hơn và to hơn trứng *P. molenkampi*. Một số tác giả đo kích thước trứng sán để định danh

Bảng 1. 2: So sánh kích thước trứng sán thu thập được ở người [48]

	Chiều dài (µm)	Chiều rộng (µm)	Dài/rộng
M. yokogawai	26,9 – 31,6 (28,5)	14,2 – 18,2 (16,8)	1,48 – 2,11 (1,7)
S. falcatus	25,3 – 29,2 (27,2)	11,1 – 13,4 (12,5)	2,00 -2,57 (2,17)
H. h. nocens	23,7 – 29,2 (25,7)	14,2 – 15,8 (15,4)	1,5 – 2,06 (1,67)
P. summa	19,8 – 22,9 (21,6)	11,1 – 13,4 (12,1)	1,63 – 1,99 (1,78)
C. sinensis	25,3 – 33,2 (28,3)	14,2 – 17,4 (15,9)	1,6 – 2,0 (1,78)

Theo Ditrich O (1992), chỉ số Faust-Meleney index (FMI) giúp phân biệt trứng sán lá Opisthorchiidae và Heterophyidae thành 4 nhóm, chỉ số này quan trọng hơn là chiều dài hay chiều rộng của trứng. Tuy nhiên tác giả cũng khuyến cáo phải quan sát ít nhất 10 trứng để thấy được hình dạng của trứng, đo đạc ít nhất 30 trứng để thu được các giá trị; giá trị trung bình và độ lệch chuẩn quan trọng hơn chiều dài, chiều rộng trong định loại trứng sán. Mặc dù đặc điểm hình thái trứng sán không phù hợp để định danh sán nhưng vẫn có thể phân biệt được trứng của một vài loại sán quan trọng như *O.viverrini, C.sinensis, H.taichui, H. pumilio, H. yokogawai, S. falcatus*, và *Metagonimus sp*. [104].

Một số tác giả khác dựa vào nhuộm bằng các kỹ thuật khác nhau để định danh như nhuộm iod phát hiện thể ưa iod (iodophilic body) [89], nhuộm kali permanganate, nhuộm xanh methylene [105].

WHO phân loại sơ bộ trứng SLGN, SLRN dựa vào đặc điểm vỏ nang, kích thước, gai, vai…Tuy nhiên bảng phân loại của WHO chỉ có trứng của 4 loài sán lá nhỏ và có những đặc điểm rất khó phân biệt rõ ràng giữa các loài sán *C. sinensis, O. felineus, H. heterophyes* và *M. yokogawai* [106].

+ Định danh dựa vào hình thái trong kính hiển vi điện tử: Trong kính hiển vi điện tử quét, vỏ trứng sán khác nhau rõ hơn như trứng *O. viverrini* có những đường vân rõ trông giống như vỏ dưa; trứng *H. taichui* có những đường vân xoăn, giống như sợi chỉ và vai, núm rõ. Trứng *H. pumilio* cũng có những đường vân và vai rõ. Trứng *P. bonnei* và *P. molenkampi* có vỏ mịn; vai và núm nhỏ [107]. Trứng *C. sinensis* được bao phủ bởi những đường vân nổi bật giống như vỏ dưa. *G. seoi* và *S. fuscata* có vỏ nhẵn, bề mặt không có các cấu trúc nổi lên như trứng *C. sinensis*. Trứng của *Metagonimus spp*., *H. continua*, *H. nocens* và trứng *S. falcatus*, trên bề mặt có những đường vân nhỏ có thể nhận ra mặc dù không rõ bằng *C. sinensis*. Tuy nhiên, trên bề mặt trứng *Metagonimus spp*. các đường vân nhỏ ngắn, của *H. continua, H. nocens* và trứng *S. falcatus* tương đối dễ thấy hơn. Đặc trưng trên bề mặt của trứng *P. summa* là các cấu trúc xoăn giống như sợi chỉ, gần giống trứng *C. sinensis*. Trứng một số loài, bao gồm *C. sinensis*, *P. summa*, *H. continua* và *H. nocens* nắp rõ ràng và vành vai rõ. Tuy nhiên, trứng của *G. seoi*, *M. yokogawai* và *S. fuscata* vành vai không rõ. Nắp trứng *G. seoi* rộng và lớn, của *H. nocens* và *S. falcatus* hẹp và nhỏ. Gai phía sau có mặt trong trứng của *C. sinensis, P. summa* và *Metagonimus spp*, nhưng không có ở trứng những loài khác [108]. Những nghiên cứu này cho thấy có thể ứng dụng kính hiển vi điện tử để phân biệt các loại trứng SLGN, SLRN tuy nhiên rất khó ứng dụng trong xét nghiệm thường qui hoặc điều tra cộng đồng.

- Kỹ thuật định danh sán trưởng thành: Chẩn đoán định danh loài sán có thể thực hiện sau khi tẩy sán và thu sán trưởng thành. Các đặc điểm chính giúp phân loại sán theo hình thái là hình dáng, kích thước, đặc điểm giác bụng, giác miệng, các cơ quan nội tạng chủ yếu là cơ quan sinh dục.

Ở Việt Nam một số nghiên cứu cũng định danh sán trưởng thành. Nguyễn Văn Đề (2006) nghiên cứu tình trạng nhiễm sán lá lây truyền qua cá tại Nam Định, thu hồi sán trưởng thành trên 33 người và xác định được các loài *C. sinensis, H. taichui, H. pumilio, H. yokogawai, S. falcatus, P. varium*. Ngọ Văn Thanh (2016) điều tra xét nghiệm phân bằng kato-katz, sau đó tẩy sán, thu hồi sán trưởng thành (trên 9 bệnh nhân) định danh bằng hình thái và sinh học phân tử, phân tích gen

cox1 và ITS2, xác định được loài sán tại địa điểm nghiên cứu là *C. sinensis, H. taichui* và *H. pumilio* [69]. Đỗ Trung Dũng cũng chọn lựa 33 người có EPG > 1.000 để tẩy sán và thu hồi sán trưởng thành, định danh bằng hình thái, phát hiện được có các loài *C. sinensis*, *H. pumilio, H. taichui, H. yokogawai, S. falcatus* [109].

Nhìn chung dựa vào các đặc điểm hình thái sán trưởng thành có thể phân biệt được các loài SLGN, SLRN. Tuy nhiên cần phải thu được sán trưởng thành còn nguyên vẹn, phải nhuộm màu để có thể nhìn thấy các chi tiết cấu tạo giúp định loài sán. Định danh SLGN ở người tương đối dễ dàng do chỉ có 3 loài, tuy nhiên số lượng loài SLRN rất lớn, cần những chuyên gia quen thuộc với định danh sán bằng hình thái. Những kỹ thuật này rất khó áp dụng thường qui hay trên qui mô lớn, do đó các nghiên cứu thường chỉ tập trung định danh một số đối tượng nhất định trong cộng đồng.

- Kỹ thuật định danh ấu trùng sán: Ấu trùng sán có thể định danh nhờ vào các đặc điểm hình thái. Các đặc điểm thường được ứng dụng trong định danh là giác bụng và giác miệng, răng xung quanh giác, hầu, thực quản và ruột, tế bào lửa, tuyến bài tiết, lỗ bài tiết và mầm sinh dục: tinh hoàn, buồng trứng, chất noãn hoàng, gonotyl, ống sinh dục và cơ quan tiếp nhận, gai miệng, vỏ gai .... Tuy nhiên do ấu trùng là giai đoạn trung gian, một số cấu trúc chưa phát triển nên trong một số trường hợp cần gây nhiễm ấu trùng cho động vật thực nghiệm, sau đó thu hồi sán trưởng thành, nhuộm và định danh. Động vật thực nghiệm thường dùng là mèo [110], chuột Hamster [58], chuột nhắt [73], chuột bạch [66]…

1.2.1.2. Kỹ thuật sinh học phân tử

Do phân bố trùng nhau và sự giống nhau về hình thái SLGN, SLRN định danh chính xác bằng hình thái rất khó khăn. Sinh học phân tử có tiềm năng lớn ứng dụng trong định danh SLGN, SLRN.

- PCR với mồi đặc hiệu loài: Đa hình đặc hiệu loài tại những vị trí nhất định có thể được sử dụng để phát triển các đầu dò phân tử (probe) đặc hiệu loài. Những probe này có thể được sử dụng như bộ mồi chuyên biệt sẽ chỉ khuếch đại một số loài nhất định. Sự khuếch đại PCR sẽ dẫn đến có các sản phẩm khuếch đại có kích

thước khác nhau, đặc hiệu cho từng loài. Phương pháp này được phát triển để phân biệt một số loài giun sán, bao gồm các loài thuộc họ Heterophyidae [100].

Wongratanacheewin (2001) nghiên cứu xét nghiệm PCR đặc hiệu loài để xác định loài sán lá gan *O. viverrini*, sử dụng gen Cox1 (417bp) và ITS2 (296 bp) [111]. Sato đã sử dụng ITS1 và ITS2 của DNA ribosome để phân biệt giữa *O. viverrini, C. sinensis, H. pumilio* và *H. taichui*. Các tác giả cho rằng vùng ITS1 là một dấu hiệu hữu ích để phân biệt trứng của *O. viverrini, C. sinensis, H. pumilio* và *H. taichui* trong các mẫu phân [112].

Huang và cộng sự (2012) dùng cặp mồi CStjd1 và CStjd2 khuếch đại một phần vùng ITS xác định *C. sinensis* [113].

Tại Việt Nam Nguyễn Văn Đề và cộng sự (2004) phân tích trình tự 446 bp và 147 acid amin trong đoạn gen cox1 đã xác định loài SLGN trên người tại Nam Định và Ninh Bình là *C. sinensis* [63]. Nghiên cứu 2005 dùng cặp mồi OvCO1F và JB4.5R nhân đoạn gen dài 326 bp của gen cytochrome oxidase 1 (cox1), so sánh với một số chủng quốc tế thấy: Chủng *Opisthorchis* Việt Nam tương đồng với chủng Khon Kaen, Thái Lan; chủng *Clonorchis* Việt Nam tương đồng với chủng *Clonorchis sinensis* của Trung Quốc, Hàn Quốc [114].

Kim Văn Vạn (2007) nghiên cứu phân biệt *H. taichui* và *H. pumilio*, sử dụng chỉ thị ITS2; mồi 3SF và BD2R; khuếch đại đoạn gen của *H. taichui* có kích thước 446 bp; của *H. pumilio* là 290 bp; khác nhau 154 nucleotide giữa vị trí 198 và 352 [115].

- PCR đa mồi: Le TH (2006) nghiên cứu áp dụng PCR đa mồi phân biệt trứng sán *C. sinensis* và *O. viverrini* trong phân: tác giả dùng hai cặp mồi khuếch đại vùng gen ty thể, CsF và CsR; OvF và OvR; kết quả cho ra hai sản phẩm có kích thước khác nhau giúp phân biệt hai loài sán, kích thước 612 bp với *C. sinensis*, kích thước 1357 bp với *O. viverrini* [116]. Một nghiên cứu sử dụng cặp mồi Hapt_F và Hapt_R1 khuếch đại sản phẩm 170 bp của *H. taichui*; OpV-1F và OpV-1R khuếch đại sản phẩm 319 bp của *O. viverrini* và có thể phân biệt hai loài sán này [117].

- PCR-RFLP: Đã được phát triển và áp dụng thành công cho chẩn đoán SLGN, SLRN. Thaenkham, U. và cộng sự (2007) dùng cặp mồi (COI-OV-Hap F&R) khuếch đại gen COI, sử dụng enzyme phân cắt hạn chế AluI, phân biệt *O. viverrini, C. sinensis và H. taichui* [118]. Kang (2008) nghiên cứu vùng rDNA 18S, ITS1 và 5,8S phân biệt sán *O. viverrini, O. felineus*, *C. sinensis* với 3 enzyme MunI; NheI và XhoI [119]. Traub (2009) thiết kế mồi từ vùng ITS2 sau đó dùng enzyme AcuI phân biệt *O. viverrini, C. sinensis* và *H. taichui* [120]. Buathong (2017) nghiên cứu khuyếch đại vùng ITS2, enzyme FauI cắt sản phẩm PCR phân biệt ba loài sán *O. viverrini, C. sinensis* và *H. taichui* [43].

Một số kỹ thuật khác như khuếch đại đa hình ngẫu nhiên DNA (randomly amplify polymorphic DNA - RAPD), Wongsawad và cộng sự (2009) đã phát triển một PCR DNA đa hình khuếch đại ngẫu nhiên ở nhiệt độ cao (high annealing temperature random amplified polymorphic DNA, HAT- RAPD) phân biệt *O. viverrini* và *H. taichui* [121]. Real-time PCR cho kết quả nhanh, hiệu suất cao, độ nhạy và độ đặc hiệu cao phát hiện và ước lượng mức độ nhiễm *C. sinensis* và *O. viverrini* [122], [11].

- Giải trình tự : PCR và giải trình tự gen nhân, ty thể, so sánh với các chuỗi đã biết để định danh mẫu chưa biết [123]. Nhìn chung giải trình tự gen giúp thu được nhiều thông tin di truyền, tuy nhiên tốn kém hơn các kỹ thuật PCR khác. Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa (2006) đã giải trình tự gen cox1 sán trưởng thành ở miền Bắc Việt Nam, xác định loài sán là *C. sinensis* [123].

Mặc dù kỹ thuật sinh học phân tử rất có giá trị trong định danh sán tuy nhiên thông thường các nghiên cứu chỉ tập trung vào các loài phổ biến ở từng khu vực, ít chú ý tới các loài ít gặp. Mặt khác khi định danh trứng sán trong phân gặp trở ngại là có rất nhiều yếu tố ức chế phản ứng PCR hiện diện trong phân. Ngoài ra độ nhạy phụ thuộc vào cường độ nhiễm trứng sán. Thông thường trong cộng đồng đa số người nhiễm SLGN, SLRN thường nhiễm mức độ nhẹ, mật độ trứng trong phân thấp ảnh hưởng tới khả năng tách chiết được DNA của sán [9].

1.2.2. Nghiên cứu xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở Việt Nam

Trong vài năm trở lại đây, các kỹ thuật PCR khác nhau đã được nghiên cứu phát triển để phát hiện nhiễm trứng sán lá nhỏ ở trong phân và ấu trùng trong cá, ốc. Việc phát hiện DNA của các loài ký sinh trùng này bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự, realtime PCR có thể thay thế các kỹ thuật chẩn đoán truyền thống [101]. Các kỹ thuật sinh học phân tử có độ nhạy, độ đặc hiệu cao hơn kỹ thuật xét nghiệm soi tươi trực tiếp và kỹ thuật miễn dịch ngay cả khi cường độ nhiễm sán thấp [16], [124]. Tuy nhiên, các kỹ thuật này khó áp dụng tại các cơ sở y tế do phải đầu tư hệ thống phòng thí nghiệm hiện đại, đào tạo nhân lực và chi phí đắt. Vì vậy, hiện nay kỹ thuật sinh học phân tử vẫn chủ yếu được sử dụng trong các phòng thí nghiệm [16], [124], [19].

1.2.2.1. Nghiên cứu xác định thành phần loài sán sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

Đa số các điều tra ứng dụng xét nghiệm phân để xác định tình trạng nhiễm ở người. Chưa có nghiên cứu nào định danh trứng sán bằng sinh học phân tử. Có một số nghiên cứu định danh sán trưởng thành thu được ở người dựa vào các đặc điểm hình thái hoặc ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử.

Bằng chỉ thị gen ty thể, nghiên cứu của Ngô Thị Hương và CS (2006) tại Bình Định và Phú Yên cho thấy, giữa các chủng sán lá nhỏ của Việt Nam và giữa các chủng của Việt Nam và Thái Lan có tỷ lệ sai khác < 1% [125].

Đỗ Trung Dũng (2007) chọn 33 người có cường độ nhiễm cao (EPG > 1.000) để tẩy sán và thu hồi sán trưởng thành, định danh bằng hình thái, phát hiện được có các SLGN *C. sinensis* (51,5%), SLRN *H. pumilio* (100%), *H. taichui* (69,7%), *H. yokogawai* (3%), *S. falcatus* (6,1%) [109].

Nguyễn Văn Đề (2007) cũng sử dụng chỉ thị phân tử gen nhân ITS2, 18S và chỉ thị gen ty thể cox1, nad1 để xác định thành phần loài sán lá và SLRN ở Việt Nam [126].

Đặng Thị Cẩm Thạch (2008) định danh sán bằng giải trình tự gen cox1 thấy rằng tất cả sản trưởng thành thu thập được từ những người nhiễm tại Tân Thành và Yên Lộc, huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình là *C. Sinensis* [15].

Kim Văn Vạn (2009) đã sử dụng chỉ thị gen nhân ITS2 để xác định và phân biệt 2 loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui* và *H. pumilio*. Tác giả này chỉ ra rằng, đoạn ITS2 của H. taichui và *H. pumilio* ở Việt Nam có tỷ lệ tương đồng cao (99-100%) so với H. taichui và *H. pumilio* ở Thái Lan [97].

Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa (2011) định danh bằng hình thái sán trưởng thành thu được ở người nhiễm, sau khi nhuộm carmine acetic thấy trong số 10 người tại Rạng Đông, Nghĩa Hưng, Nam Định nhiễm sán có 9 người nhiễm *C. sinensis* và 10 người bị nhiễm SLRN [127]. Định danh sán trưởng thành thu được ở người, giải trình tự gen cox1 (bằng cách sử dụng cặp mồi JB3FR JB4.5R) và ITS2 (sử dụng các cặp mồi 3SF-BD2R), xác định được sán thu được trên người ở Nam Định là *C. sinensis, H. pumilio* và *H. taichui* [127].

Nguyễn Thu Hương (2013) sử dụng chỉ thị gen nhân ITS1 để giám định một trường hợp SLGN lạc chỗ hiếm gặp tại Hà Nội [128].

Nguyễn Văn Chương (2014) sử dụng chỉ thị gen ty thể để định loài SLGN ký sinh ở người tại Quảng Trị [129].

Đỗ Trung Dũng (2014) giải trình tự đoạn gen ty thể cox1 và gen nhân 28S ribosome định danh được các loài sán lá ruột nhỏ *H. taichui, H. pumilio, S. falcatus, C. formosanus, E. japonicus* tại một số tỉnh miền Bắc [130].

Ngọ Văn Thanh (2016) định danh sán bằng giải trình tự đoạn gen cox1, xác định được loài sán tại điểm nghiên cứu là: *C. sinensis, H. taichui, H. pumilio* [28].

1.2.2.2. Nghiên cứu xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên cá

Phần lớn các nghiên cứu thành phần loài sán ở cá dựa vào đặc điểm hình thái nang ấu trùng. Bùi Ngọc Thanh nghiên cứu định danh nang ấu trùng sán trên cá dựa vào đặc điểm hình thái, sau đó gây nhiễm trên mèo và xác định được nang ấu trùng của *C. sinensis* trên cá mương, cá thiểu ở Ninh Bình [110]. Nghiên cứu trên 1.200 cá ở miền bắc Việt Nam thấy hầu hết metacercariae trên cá là SLRN

Heterophyidae [71]. Nghiên cứu ở Nghệ An phát hiện các loài sán là *H. pumilio*, *H. taichui*, *H. yokogawai*, *C. formosanus, S. falcatus* và *E. Japonicus* [71].

Phan Thị Vân (2010) tại tỉnh Nam Định trên 1543 con cá chỉ có một con cá nhiễm *C. sinensis;* 50% cá nhiễm *H. pumilio*; bốn loài FZT ruột khác được tìm thấy ở tỷ lệ thấp [73]. Nghiên cứu trên các trại cá giống tại Bắc Ninh, Nam Định, Ninh Bình thấy tỷ lệ nhiễm *Clonorchis* ở cá ương là 1,5%; tỷ lệ nhiễm SLRN cao (*H. pumilio* 55,6% và *C. formosanus* 41,0%, *H. taichui* là 0,3%; không tìm thấy *S. falcatus*, *C. sinensis* chỉ phát hiện được ở trắm cỏ (1.9%); Rohu (0.5%) và cá mè (2.4%) [74]. Nghiên cứu tại Nam Định trên 3820 cá thấy nang ấu trùng *C. sinensis* chỉ xuất hiện ở cá mè, *H. taichui* xuất hiện ở cá rô cá mè,cá trắm cỏ...; *H. pumilio* xuất hiện ở mọi loài cá nghiên cứu [32]

Năm 2012 điều tra cá nước ngọt thu thập từ các chợ Hà Nội, Nam Định phát hiện nang ấu trùng *H. pumilio*, *H. taichui*, *C. formosanus*, và *P. varium*, *S. falcatus* và *Heterophyopsis continua*; tỷ lệ nhiễm *H. pumilio* 80,0% [58]. Nghiên cứu tại Nghĩa Hưng, Nam Định (2015), thu thập trên 200.000 metacercariae nhưng không phát hiện được nang ấu trùng của *C. sinensis*, loài *H. pumilio* chiếm tỷ lệ cao nhất (77,3%), còn lại là *H. taichui, H. yokogawi, C. formosanus, Procerovum* sp [131].

Dự án FIBOZOPA (2004-2012) cho rằng nang ấu trùng của SLN phổ biến hơn so với *C. sinensis*, tìm thấy nang ấu trùng của nhiều loài SLRN (*H. pumilio, H. taichui, H. yokogawai, C. formosanus, S. falcatus, P. varium* và *E. japonicus*), trong khi metacercariae *C. sinensis* không được tìm thấy ở Nghệ An, hoặc hiếm thấy ở Nam Định (chỉ có một trong 1185 cá mè (*H. Molitrix)*), và Ninh Bình (chỉ có một trong tám cá cá mương (*H. Leucisculus)*) cũng như tỷ lệ lây nhiễm rất thấp ở các tỉnh phía Bắc (0,1-0,4% của 1500 cá của năm loài), những con số này cho thấy sự phổ biến của metacercariae *C. sinensis* trong cá ở miền bắc Việt Nam rất thấp so với báo cáo trước đó [62].

Nghiên cứu trên 9.266 cá con tại Ninh Bình trong năm 2009 và 5.911 trong năm 2010 từ vườn ươm tại Nam Định, Thái Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa phát

hiện được nang ấu trùng SLN, tỷ lệ *C. sinensis* rất thấp (0,05%), chủ yếu Heterophyidae (94%) gồm *C. formosanus*, *H. pumilio* và *H. yokogawi* [75].

Đa số các nghiên cứu trên cá ở miền Bắc Việt Nam cho thấy tỷ lệ nhiễm SLRN rất cao, ngược lại tỷ lệ nhiễm ấu trùng SLGN *C. sinensis* rất thấp. Ấu trùng các loài SLRN thường gặp nhất là *H. pumilio, H. taichui, C. formosanus*; ngoài ra còn gặp *H. yokogawi, S. falcatus, P. varium* và *E. japonicus*, *Heterophysopsis continua, Diplostomum spp*.

1.3. Một số nét về địa điểm nghiên cứu

Ninh Bình nằm ở đồng bằng sông Hồng nằm giữa 3 vùng kinh tế: vùng Hà Nội, vùng duyên hải Bắc Bộ và vùng duyên hải miền Trung. Có diện tích:1.400 km², dân số là 982.487 người (theo điều tra dân số 1/4/2019), 21% dân số sống ở đô thị và 79% dân số sống ở nông thôn, mật độ dân số đạt 642 người/km². Ninh Bình được coi là nơi có vị trí đặc biệt về giao thông, địa hình, lịch sử văn hóa đồng thời sở hữu 2 khu vực là di sản thế giới (Quần thể danh thắng Tràng An) và khu dự trữ sinh quyển thế giới (Cồn Nổi Kim Sơn) và chỉ có 2 huyện duyên hải là Yên Khánh và Kim Sơn có địa hình bằng phẳng.

Huyện Kim Sơn là huyện cực nam của miền Bắc Việt Nam, cách thành phố Ninh Bình 33km, cách Hà Nội 126km có quốc lộ 10 mới xuyên ngang huyện; quốc lộ 21B và quốc lộ 12B xuyên dọc huyện đi qua vùng kinh tế ven biển phía Nam. Dân số năm 2018 là 172.399 người. Huyện Kim Sơn có 25 đơn vị hành chính cấp xã trực thuộc, bao gồm 2 thị trấn và được chia được chia thành 2 khu vực: Khu vực bắc Kim Sơn và nam Kim Sơn. Kim Sơn là khu vực nằm trong vùng SLGN lưu hành. Tại đây có nhiều điều kiện thuận lợi cho SLGN lưu hành như một bộ phận dân cư có thói quen ăn gỏi cá, điều kiện vệ sinh môi trường còn hạn chế. Đã có một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm SLGN ở huyện Kim Sơn khá cao mặc dù vậy trong khoảng 10 năm nay chưa có các nghiên cứu về tỷ lệ cũng như các đặc điểm dịch tễ học nhiễm SLGN tại đây. Hiện Ninh Bình đang có kế hoạch thành lập khu kinh tế ven biển Kim Sơn tại vùng biển bãi ngang - cồn nổi và 7 xã ven biển Kim Sơn, trong đó có Kim Đông, Kim Tân. Kim Đông được UNESCO đưa vào vùng bảo vệ đặc biệt của khu dự trữ sinh quyển châu thổ sông

Hồng. Đây là một khu dự trữ sinh quyển thế giới ở Việt Nam. Tính nổi bật toàn cầu ở đây được thể hiện ở cảnh quan sinh thái với những thay đổi địa chất diễn ra mau lẹ, đa dạng sinh học với các loài chim nước trú ngụ trong rừng phòng hộ ven biển. Cảnh quan sinh thái hoang sơ, thích hợp với việc khai thác du lịch đồng quê, nghỉ dưỡng và tắm biển. Tại xã Kim Đông đã có nhà nghỉ sóng biển nằm ở chân đê Bình Minh 2, điểm cuối của đường tỉnh lộ 481. Đây là nơi dừng chân qua đêm của du khách tham gia du lịch đồng quê tại vùng biển Kim Sơn. Xã Kim Tân còn có bến cá cửa Đáy được xây dựng là đầu mối vận chuyển cá biển vào đất liền. Xã này thuộc vùng chuyển tiếp của khu dự trữ sinh quyển thế giới châu thổ sông Hồng.

Huyện Yên Khánh là một huyện nằm ở phía đông nam tỉnh Ninh Bình. Diện tích 138 km², dân số 142.029 người (2009), Yên Khánh có 19 đơn vị hành chính cấp xã trực thuộc, bao gồm thị trấn Yên Ninh (huyện lỵ) và 18 xã trong đó có xã Khánh Thành, Khánh Thủy cách trung tâm thành phố Ninh Bình 22 km, phía nam huyện Yên Khánh. Đây là 2 xã có Đường cao tốc Ninh Bình - Hải Phòng - Quảng Ninh đi qua. Kinh tế 2 xã này chủ yếu là khai thác thuỷ hải sản và nông nghiệp với các nghề chính là nuôi tôm, cua, ngao, trồng cói và lúa. Hàng năm phù sa bồi đắp mở rộng thêm ra biển hơn 100m đất. Huyện Yên Khánh giáp giới với Kim Sơn, có một bộ phận dân cư cũng có thói quen ăn gỏi cá nên cũng có thể có nguy cơ nhiễm SLGN.

Chương 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Xác định một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016.

2.1.1. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người

2.1.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Đối trượng nghiên cứu: Người dân sống tại huyện Kim Sơn và Yên Khánh của tỉnh Ninh Bình.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Người dân từ 15 tuổi trở lên không phân biệt nam, nữ, dân tộc sống tại điểm nghiên cứu, tự nguyện tham gia nghiên cứu

Không phân biệt giới tính, trình độ học vấn, nghề nghiệp.

Có khả năng trả lời phỏng vấn.

Đồng ý tham gia nghiên cứu và cung cấp mẫu phân.

- Tiêu chuẩn loại trừ

Người mới sống tại địa điểm nghiên cứu (< 1 năm).

Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Người đang bị bệnh cấp tính.

Người bị bệnh tâm thần.

Có tiền sử dị ứng thuốc điều trị sán.

Bệnh tim, gan, thận nặng.

Đã uống thuốc tẩy sán < 6 tháng

2.1.1.2. Thời gian, địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 3/2016 – 12/2016.

- Địa điểm nghiên cứu

+ ***Thực địa:*** **Ninh Bình**

Huyện Kim Sơn: Lựa chọn 2 xã Kim Đông và Kim Tân

Xã **Kim Đông**: Diện tích: 5,20 km², Dân số: 2102 người, Mật độ dân số: 404 người/km². Nằm ở cửa hữu sông Đáy, có quốc lộ 12B (tỉnh lộ 481 cũ) giao thông thuận tiện, có Bến xe Kim Đông, cảng biển Kim Sơn 5 km, vừa là cảng thủy sản vừa là khu neo đậu cho tàu bè. Có chợ đầu mối thủy sản Kim Đông... đều là những công trình quan trọng đã được xây dựng tại xã này.

Xã **Kim Tân** Diện tích: 8,22 km² Dân số: 6408 người Mật độ dân số: 780 người/km là tên một xã nằm ở phía nam huyện Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình. Đây là một xã thuộc vùng khai hoang lấn biển khu vực phía nam huyện Kim Sơn (Nơi có vùng ven biển rộng gần 6.000 ha đã được UNESCO công nhận là khu dự trữ sinh quyển thế giới). Các xã này nằm ở ven biển có thế mạnh về khai thác và nuôi trồng thuỷ hải sản đặc biệt là tôm, ghẹ, sò, cua v.v…

Hình 2. 1: Địa điểm nghiên cứu tại Ninh Bình

Huyện Yên Khánh: lựa chọn 2 xã Khánh Thành, Khánh Thủy

Xã **Khánh Thành** Diện tích: 7,83 km², Dân số: 7.853 người, Mật độ dân số: 1.003 người/km². Xã **Khánh Thủy** diện tích 7,55 km², dân số năm 1999 là 6.258 người,mật độ dân số đạt 829 người/km².

+ Trong phòng thí nghiệm: Labo giun sán, bộ môn Ký sinh trùng, Học viện Quân y.

2.1.1.3. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

- Cỡ mẫu nghiên cứu: Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ trên người theo công thức:

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \frac{p(1-p)}{(p.\varepsilon)^2}$$

Trong đó:

n: Cỡ mẫu tối thiểu một huyện cần đạt được trong nghiên cứu.

$Z_{1-\alpha/2}$ = hệ số tin cậy 95%, có giá trị 1,96.

p: Ước lượng tỉ lệ, p trong nghiên cứu này được ước lượng bằng tỷ lệ nhiễm SLN dự kiến, được ước tính là p=0,15 theo nghiên cứu của Ngọ Văn Thanh về tỉ lệ nhiễm SLN ở huyện Nga Sơn, tỉnh Thanh Hóa là 14,5%, năm 2014 [69].

ε: Là sai số tương đối ta lấy ε bằng 0,35.

Thay vào công thức tính cỡ mẫu được n = 184,9 làm tròn là 185 người/huyện.

- Cỡ mẫu phỏng vấn KAP: toàn bộ những người tham gia nghiên cứu vừa được xét nghiệm phân đồng thời vừa được phỏng vấn KAP.

- Phương pháp chọn mẫu:

Chọn huyện chủ đích: Kim Sơn là khu vực nằm trong vùng SLGN lưu hành, đã có một số nghiên cứu tại đây phát hiện SLGN lưu hành. Huyện Yên Khánh giáp giới với Kim Sơn, trước kia là một phần của huyện Kim Sơn, cũng có những thông báo về sự lưu hành của SLGN tại đây. Đã có một số nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm SLGN ở huyện Kim Sơn, Yên Khánh khá cao mặc dù vậy trong khoảng 10 năm nay chưa có các nghiên cứu về tỷ lệ cũng như các đặc điểm dịch tễ học nhiễm SLGN tại đây.

Chọn xã chủ đích: Mỗi huyện chọn 2 xã đại diện có mật độ dân cư cao, nhiều ao hồ nuôi cái, dân cư có thói quen ăn gỏi cá, có vị trí giao thông thuận tiện, đa dạng sinh thái, thuận tiện cho véc tơ truyền bệnh. Xã Kim Tân là một xã bãi ngang, vùng khó khăn, tại đây người dân thường đánh bắt cá mòi về ăn gỏi cá và bán cho các địa bàn lân cận.

Lập danh sách chọn cá thể điều tra theo phương pháp ngẫu nhiên có hệ thống (hệ số k). Thu mẫu phân theo từng cá thể cho đến khi đủ cỡ mẫu tính được.

- Nội dung nghiên cứu:

+ *Xác định tỷ lệ, cường độ nhiễm* SLGN, SLRN trên người tại điểm nghiên cứu: xét nghiệm tìm trứng và sán trưởng thành trong phân.

+ *Một số đặc điểm dịch tễ học SLGN, SLRN:* kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống SLGN, SLRN của người dân tại địa điểm nghiên cứu, các yếu tố liên quan nhiễm SLGN, SLRN.

- Vật liệu nghiên cứu

+ *Dụng cụ*

Phiếu phỏng vấn điều tra nhiễm SLGN, SLRN (phụ lục).

Dụng cụ thu thập mẫu phân: hộp lấy mẫu, nhãn ghi tên đối tượng.

Dụng cụ xét nghiệm phân: lam kính, kính hiển vi, máy ly tâm, ống fancol 15 ml, cân phân tích.

+ *Hóa chất:* Dung dịch formol, ether.

- Các chỉ số đánh giá

+ *Đặc điểm nhân khẩu học* đối tượng nghiên cứu: tuổi, giới, trình độ học vấn, nghề nghiệp...

+ *Tỷ lệ nhiễm sán:* số người xét nghiệm có trứng SLGN, SLRN trên tổng số người xét nghiệm, tính bằng tỷ lệ phần trăm (%).

+ *Cường độ nhiễm sán:* tính bằng số trứng trong một gam phân (EPG), phân loại thành 3 mức là nhiễm nhẹ (< 1.000), trung bình (1.000 - 10.000 EPG) và nặng (>10.000 EPG).

+ *Kiến thức thái độ thực hành* phòng chống SLGN, SLRN của người dân địa phương.

+ *Yếu tố liên quan nhiễm* SLGN, SLRN trên người tại điểm nghiên cứu.

- Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

+ *Chuẩn bị phiếu phỏng vấn điều tra* nhiễm SLGN, SLRN***:*** Dự thảo phiếu phỏng vấn; Tổ chức hội thảo khoa học tại Trung tâm phòng chống dịch bệnh tỉnh Ninh Bình. Tham dự hội thảo là một số chuyên gia về ký sinh trùng của Học viện

Quân y, trường đại học Y dược Hải Phòng, các cán bộ y tế của Trung tâm phòng chống dịch bệnh tỉnh Ninh Bình, cán bộ trung tâm y tế huyện Yên Khánh và Kim Sơn, cán bộ y tế xã tham gia nghiên cứu, đóng góp ý kiến chỉnh sửa phiếu phỏng vấn. Sau đó hoàn thiện bộ phiếu phỏng vấn.

+ ***Tập huấn cho các điều tra viên:*** Là các cán bộ của bộ môn Ký sinh trùng Học viện Quân y, cán bộ y tế của khoa Ký sinh trùng - Trung tâm phòng chống dịch bệnh tỉnh Ninh Bình, cán bộ y tế của các xã tham gia nghiên cứu về phương pháp điều tra, kỹ thuật thu thập mẫu phân.

+ ***Điều tra bằng phiếu hỏi tại cộng đồng:*** Các cán bộ điều tra sẽ gặp và phỏng vấn trực tiếp đối tượng nghiên cứu.

+ ***Kỹ thuật thu thập mẫu phân tại cộng đồng:*** sau khi phỏng vấn sẽ phát cốc lấy phân, hướng dẫn người dân thu thập mẫu phân ngay trong ngày hoặc ngày hôm sau.

+ *Kỹ thuật vận chuyển mẫu phân:* Tập trung mẫu phân về trạm y tế xã, gói kín cho vào hộp xốp, cho túi nilon chứa đá cục lên trên, đậy kín hộp xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm.

+ ***Kỹ thuật xét nghiệm phân:*** Formalin ether

Dụng cụ và hoá chất:

Máy ly tâm có các hố chứa được các ống ly tâm 15ml đáy nhọn. Dùng máy có nắp đậy kín.

Ống ly tâm, 15ml đáy nhọn (đánh dấu vạch bằng bút chì mỡ).

Bình hoặc cốc đong.

Que quấy

Cốc đong nhỏ 25,50 hoặc 100ml.

Gạc ngoại khoa hoặc lưới lọc kim loại hoặc nhựa có kích thước lỗ lọc 400µl.

Lam kính 75 x 25mm

Lá kính.

Pipet, ống hút Pasteur có quả bóp cao su.

Nút cao su cho ống ly tâm.

Giá để tube.

Dung dịch Formalin 10%

Ether, etyl axetat hay nếu không có các dung môi này có thể dùng xăng.

Lọ nhỏ giọt có chứa :

Dung dịch nước muối sinh lý (0,85% - 0,9%)

Dung dịch Lugol (dung dịch Iôt 1%)

Tiến hành:

Lấy 1 g phân cho vào 10ml formalin trong tube ly tâm và quấy đều tạo thành một dịch treo.

Lọc dịch treo qua lưới lọc có kích thước lỗ lọc 400µm hay qua 2 lớp vải gạc vào 1 tube ly tâm khác hoặc vào 1 cốc đong nhỏ. Bỏ lưới lọc.

Thêm formalin 10% vào chất trong tube để đạt được thể tích 10ml.

Thêm 3,0ml Ether hay (etyl axetat hoặc xăng). vào dich treo ở trong tube và trộn đều bằng cách đậy nắp cao su và lắc mạnh trong vòng 10 giây.

Mở nắp cao su đặt tube vào máy ly tâm, cân bằng tube và ly tâm ở tốc độ 400 – 500g trong vòng 2 – 3 phút.

Lấy tube ra khỏi máy ly tâm, chất dịch treo trong tube chia thành 4 lớp:

Lớp trên cùng: ether (hay etyl axetat hoặc xăng).

Lớp thứ 2: một nút gồm các mảnh chất béo dính vào thành ống.

Lớp thứ 3: lớp formalin

Lớp thứ 4: Cặn.

Dùng que lấy nhẹ nhàng lớp chất béo re khỏi thành ống bằng cách xoáy theo hình xoắn sau đó đổ 3 lớp trên cùng bằng một động tác nhanh gọn, dốc ngược ống ly tâm ít nhất 5 giây. Sau khi làm xong động tác trên sẽ còn một lượng nhỏ chất dịch còn lại trên thành ống chảy trở lại cặn ở đáy ống.

Trộn chất dịch với cặn (đôi khi thêm 1 giọt nước muối sinh lý để có đủ dịch hoà cặn) bằng pipet thuỷ tinh. Lấy 1 giọt cặn nhỏ lên phiến kính, phủ lá kính và xét nghiệm. Cũng có thể làm 1 tiêu bản nhuộm lugol.

Xét nghiệm tiêu bản một cách có hệ thống để đảm bảo soi toàn bộ bề mặt lá kính ở vật kính 10x, và nếu cần định loại, soi ở vật kính có độ phóng đại lớn hơn. Khi có vật thể nghi ngờ, dùng độ phóng đại cao hơn để quan sát chi tiết lớn

hơn của vật thể nghi ngờ.

Đếm toàn bộ số trứng thu được trong một gam phân, tính số lượng trứng/gam phân.

- Phương pháp kiểm soát nhiễu và sai số trong nghiên cứu

+ Kiểm soát nhiễu trong phỏng vấn tại cộng đồng

Để có bộ công cụ điều tra nhiễm SLGN, SLRN có chất lượng. Phiếu hỏi được chuẩn bị qua nhiều bước: đầu tiên là dự thảo phiếu hỏi, sau đó tổ chức hội thảo khoa học tại Trung tâm kiểm soát dịch bệnh tỉnh Ninh Bình để đóng góp ý kiến chỉnh sửa phiếu hỏi. Hoàn thiện bộ phiếu hỏi; tập huấn cho các điều tra viên.

Lựa chọn các cán bộ điều tra là các cán bộ của bộ môn Ký sinh trùng Học viện Quân y, cán bộ y tế của khoa Ký sinh trùng - Trung tâm phòng chống dịch bệnh tỉnh Ninh Bình, cán bộ y tế của các xã tham gia nghiên cứu là những người có kiến thức nhất định về chủ đề nghiên cứu, ngoài ra được tập huấn, thống nhất về phương pháp điều tra, phỏng vấn, thu thập mẫu.

+ Kiểm soát nhiễu trong xét nghiệm phát hiện tình trạng nhiễm sán

Xét nghiệm trứng sán trong phân do các kỹ thuật viên có kinh nghiệm của bộ môn Ký sinh trùng Học viện Quân y thực hiện. Với những tiêu bản dương tính tiến hành đếm song song hai kỹ thuật viên, lấy số trung bình để tính cường độ nhiễm sán.

- Phương pháp thống kê và xử lý số liệu:

+ Xử lý thống kê bằng phương pháp y sinh học.

+ Sử dụng phần mềm SPSS 16.0 tính toán các giá trị số trung bình, tỷ lệ, tỷ suất chênh (OR), khoảng tin cậy 95% (CI95%)...

Giá trị $p<0,05$ được coi là có ý nghĩa thống kê.

2.1.2. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên cá

2.1.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Sáu loài cá thường được người dân địa phương sử dụng ăn gỏi; gồm 5 loài cá nước ngọt là cá chép (*Cyprinus* sp.), cá mè (*Hypophthalmichthys* sp.), cá trắm (*Ctenopharyngodon* sp.), cá trôi (*Cirrhinus* sp.), cá rô phi (*Oreochromis*); một loài cá nước lợ là cá mòi (*Konosirus* sp.).

2.1.2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 3/2016 – 12/2018

- Địa điểm nghiên cứu

+ *Thu thập cá* ở chợ, ao các gia đình huyện Kim Sơn và Yên Khánh, tỉnh Ninh Bình.

+ *Xét nghiệm phân tích* tại labo của khoa Ký sinh trùng, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

2.1.2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: Mô tả cắt ngang.

- Cỡ mẫu nghiên cứu: tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ trên cá nước ngọt được tính toán theo công thức:

$$n = Z^2_{(1-\alpha/2)} \frac{p(1-p)}{(p.\varepsilon)^2}$$

Trong đó:

n: Cỡ mẫu tối thiểu của 1 loài cá cần đạt được trong nghiên cứu.

$Z_{1-\alpha/2}$ = hệ số tin cậy 95%, có giá trị 1,96.

p: Là tỷ lệ nhiễm ấu trùng sán lá nhỏ trên cá khoảng 0,66 [66].

ε: Là sai số tương đối từ (0,1-0,4), ta lấy ε bằng 0,25.

Theo công thức, tính toán được n = 31,6 làm tròn 32 cá thể/loài cá. Thực tế xét nghiệm 345 con cá thuộc 6 loại cá

- Phương pháp chọn mẫu:

Đến các hộ gia đình trong các xã nghiên cứu để thu thập cá tại ao cá. Do một số trường hợp cá đánh bắt được trong ao vượt nhiều hơn so với dự kiến nên cỡ mẫu tăng thành 345 con cá. Trong trường hợp một loài cá thu thập không đủ mẫu như mong muốn thì tiến hành mua tại chợ cá địa phương.

- Nội dung nghiên cứu:

+ *Xác định tỷ lệ, cường độ nhiễm nang sán ở vật chủ trung gian (cá)*: xét nghiệm cơ cá tìm nang ấu trùng

+ *Xác định tỷ lệ cá nhiễm ấu trùng*: tỷ lệ từng loại cá nhiễm nang ấu trùng sán.

+ *Xác định cường độ nhiễm:* mật độ nang ấu trùng sán lá gan nhỏ, sán lá

ruột nhỏ trên từng loài cá.

- Các chỉ số đánh giá

+ *Tỷ lệ cá nhiễm nang ấu trùng:* (số cá nhiễm nangấu trùng)/(tổng số cá xét nghiệm) x100.

+ *Tỷ lệ cá từng loài nhiễm nang ấu trùng:* (số cá cùng loài nhiễm nang ấu trùng)/(tổng số cá cùng loài xét nghiệm) x 100.

+ *Cường độ nhiễm:* (số nang ấu trùng thu được)/tổng số gam cá xét nghiệm (+).

- Giới hạn phạm vi nghiên cứu: vì không thể tiến hành điều tra tất cả các loài cá tại địa điểm nghiên cứu luận án lựa chọn những loài cá được người dân địa phương sử dụng nhiều nhất để ăn gỏi cá trong đó có cá mòi (là cá nước lợ). Tình hình nhiễm nang ấu trùng ở những loài cá này sẽ liên quan nhiều hơn đến tình hình nhiễm SLGN, SLRN ở người.

- Vật liệu nghiên cứu

+ *Dụng cụ nghiên cứu*

Dụng cụ bảo quản cá: túi nilon, hộp xốp, đá khô.

Kính lúp điện soi nổi: 01 cái.

Kính hiển vi quang học thị kính 10, vật kính 10x và 40x: 01 cái.

Cân chính xác 10-2 gam: 01 cái.

Cân đĩa 5 kg: 01 cái.

Tủ ấm: 01 cái.

Tủ lạnh: 01 cái.

Dao thái, thớt nhựa: 01 bộ.

Máy xay: 01 cái.

Thước đo 60cm (có vạch chia mm): 01 cái.

Đũa thủy tinh 20-30cm, thân tròn đường kính 0,5-0,7cm: 01 cái.

Đũa thủy tinh 15cm, thân tròn đường kính 0,5-0,7cm: 01 cái.

Cốc thủy tinh đáy bằng có mỏ 250-500ml: 01 cái.

Cốc thuỷ tinh (đáy bằng hoặc thót đáy) có mỏ 1.000 ml: 02 cái.

Rây inox mắt lưới 1x1mm, đường kính miệng rây phía trong 10 cm, chiều

cao từ mặt lưới đến miệng rây 4,5cm (100f x H45mm): 01 cái.

Ống đong thủy tinh 1.00 ml: 01 cái.

Ống đong (thủy tinh hoặc nhựa) 10-50 ml: 01 cái.

Hộp petri đường kính 9-10,5cm: 01 cặp.

Hộp petri đường kính 3-5cm: 01 cái.

Pipet pasteur (dài 15cm, đầu lớn 0,7cm, đầu nhỏ 0,1cm): 02 cái.

Quả bóp cao su: 01 cái.

Kim inox nhọn 1 đầu, dài 12-15cm, đầu kim thẳng hoặc cong: 01 cái.

+ Hóa chất

Pepsin 1:10.000 lọ 100g: 01 lọ.

HCl 37% chai 500ml (hoặc 1.000ml): 1chai.

NaCl lọ 1.000 g: 1 lọ.

- Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

+ Kỹ thuật thu thập cá và vận chuyển cá: Cá sau khi được thu thập sẽ được bảo quản trong hộp xốp có đá khô và vận chuyển trong ngày về Viện Sốt rét Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.

+ Kỹ thuật định loại cá dựa trên hình thái học: Dựa trên các đặc điểm chiều dài đầu – cuối đuôi, đầu – gốc đuôi, hình dáng thân dẹp hay tròn, màu sắc cá trắng hay xám, hình dáng, kích thước, màu sắc vảy; hình dáng miệng, đặc điểm mắt, mũi, hàm, khởi điểm vây lưng và vây bụng, đặc điểm vây... [132]

+ Kỹ thuật xét nghiệm cá: Sử dụng kỹ thuật tiêu cơ bằng pepsin và axit clohydric theo quy trình của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương để phát hiện nang ấu trùng sán trong cá.

- Các bước tiến hành

Chuẩn bị dung dịch tiêu cơ: cho 1.000ml nước cất vào cốc thủy tinh dung tích 1.000ml.

Cho thêm 6g Pepsin vào khuấy cho tan hoàn toàn,

Thêm 8ml HCl 37%, khuấy kỹ trong 4 phút đến 7 phút.

Chuẩn bị dung dịch nước muối sinh lý: cân 8,5g NaCl cho vào 1.000ml nước cất, khuấy kỹ trong 4 phút đến 7 phút.

Ghi mã số cá, xác định loài cá xét nghiệm, nguồn thu thập cá, địa chỉ thu thập. Các thông tin trên được ghi vào phụ lục 1.

Cân, đo kích thước của từng con cá được xét nghiệm và ghi lại vào phiếu.

Lấy mẫu cá xét nghiệm:

Đối với cá ≤ 50 gam thì lấy cả con cá để xét nghiệm.

Đối với cá > 50 gam: các phần khác nhau của cá như đầu, mang, cơ, vây, vẩy…, mỗi phần được lấy khoảng 5-10 gam. Tất cả lấy đủ 50 gam, trộn đều.

Xay nhỏ mẫu cá xét nghiệm bằng máy xay.

Chuyển mẫu cá đã xay nhỏ vào cốc 250-500ml có chứa 15 ml dung dịch tiêu cơ. Đối với mẫu xét nghiệm cá ≤ 50 gam: thể tích dung dịch tiêu cơ gấp 3 lần thể tích mẫu.

Trộn đều và đặt trong tủ ấm 37^0C trong 2 giờ, sau 15-20 phút khuấy đều 1 lần, lặp lại 6-8 lần.

Lọc sản phẩm tiêu cơ qua rây, thu hỗn dịch ở dưới vào cốc 500 ml - 1.000ml.

Thêm dung dịch nước muối sinh lý đến gần đầy cốc (mặt hỗn dịch cách miệng cốc 2 cm đến 3 cm), khuấy đều, để lắng 10-30 phút.

Loại bỏ phần dịch nổi một cách nhẹ nhàng và giữ lại phần lắng cặn.

Lặp lại bước 10 và 11 khoảng 3 đến 6 lần cho đến khi phần nước phía trên trở lên trong.

Xét nghiệm toàn bộ lượng cặn thu được bằng cách chuyển dần mỗi lần một lượng khoảng 20 ml chất lắng cặn vào đĩa Petri (đường kính 9-10,5cm) có 6-7ml nước muối sinh lý.

Quan sát chất lắng cặn dưới kính lúp điện, dùng kim nhọn đầu tìm và tập trung nang ấu trùng, hút toàn bộ nang ấu trùng bằng pipet pasteur và chuyển sang hộp petri 3-5cm.

Đếm số lượng nang ấu trùng sán lá ở hộp petri có đường kính 3-5cm, ghi vào phiếu.

Lưu mẫu nang ấu trùng sán lá trong ngăn mát tủ lạnh 2^0C-8^0C đến khi sử dụng.

- Phương pháp phân tích và xử lý số liệu:

Thống kê và xử lý số liệu y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 16.0 tính toán các giá trị tỷ lệ, mật độ, so sánh; giá trị p<0,05 được coi là có ý nghĩa thống kê.

- Giới hạn phạm vi nghiên cứu

+ Nghiên cứu trên người: chỉ chọn các đối tượng từ 15 tuổi trở lên. Do trong các nghiên cứu về sán lán gan nhỏ và sán lá ruột nhỏ trước cho thấy lứa tuổi dưới 15 tuổi tỷ lệ nhiễm sán rất ít và lứa tuổi này việc trả lời bộ câu hỏi thường cần có người giám hộ dễ gây sai số.

+ Trên cá: chọn các loài cá hay được người dân địa phương sử dụng ăn gỏi, qua phỏng vấn KAP tại cộng đồng.

+ Các vật chủ khác: vật chủ chính (chó, mèo…), vật chủ phụ 1 (ốc): do hạn chế về thời gian nên không đánh giá trên các vật chủ này

2.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử.

2.2.1. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người bằng phương pháp hình thái.

2.2.1.1. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng phương pháp hình thái.

- Đối tượng nghiên cứu

+ Trứng sán lá từ người nhiễm ở mục tiêu 1

+ Sán trưởng thành thu được từ người.

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu

+ *Thời gian nghiên cứu:* Từ tháng 3/2016-3/2019.

+ *Địa điểm nghiên cứu:* Labo giun sán bộ môn Ký sinh trùng, Học viện Quân y.

- Phương pháp nghiên cứu

+ *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu mô tả, thực nghiệm tại labo

+ *Cỡ mẫu:*

Trứng sán: Các mẫu trứng sán lá nhỏ của toàn bộ những người có kết quả

xét nghiệm phân dương tính với sán lá nhỏ ở mục tiêu 1.

Sán trưởng thành: Tất cả sán trưởng thành thu được từ 10 người có cường độ nhiễm cao nhất sau tẩy sán, thu hồi sán trưởng thành.

+ Nội dung nghiên cứu

Xác định thành phần loài trứng sán thu được trong phân.

Xác định thành phần loài sán trưởng thành thu được từ người nhiễm .

+ Vật liệu nghiên cứu

Dụng cụ:

Dụng cụ thu thập mẫu phân: hộp lấy mẫu, nhãn ghi tên đối tượng.

Dụng cụ xét nghiệm phân: lam kính,

Kính hiển vi,

Máy ly tâm,

Ống fancol 15 ml,

Cân phân tích.

Hóa chất

Dung dịch Carmin cồn axit : gồm carmin 5g; axit clohydric 5ml, cồn 90^0 200ml. Trộn kỹ carmin và axit, để một tiếng rồi cho thêm cồn, đổ vào lọ, đem hấp cách thủy. Đậy nút có lỗ. Đun sôi nhỏ lửa cho đến khi carmin tan hoàn toàn. Sau đó thêm cồn 90^0 cho đến khi đủ 200ml.

+ Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu xác định loài bằng hình thái

Xác định loài trứng sán: Dự trên hướng dẫn của WHO về khoá định loại xác định hình dạng trứng của ký sinh trùng (WHO technique guideline, 1991) [155]. Quan sát dưới kính hiển vi quang học các đặc điểm hình thái trứng sán để định loại trứng sán với các đặc điểm như sau:

+ Đo đạc kích thước chiều dài, chiều rộng;

+ Nhận định hình dạng của trừng;

+ Xác định giai đoạn phát triển của trứng trong phân;

+ Xác định độ dầy, mỏng của vỏ trứng;

+ Xác định mầu sắc của trứng;

+ Sự xuất hiện của các đặc điểm đặc trưng như nắp, gai, nút, móc

Kỹ thuật thu hồi sán trưởng thành: lựa chọn 10 người có cường độ nhiễm sán cao nhất được tẩy sán để thu hồi sán trưởng thành. Tối hôm trước đối tượng ăn nhẹ, với thức ăn lỏng. Ngày hôm sau được uống praziquantel (liều 25 mg/kg x 3 lần /ngày); 1 giờ sau khi uống praziquantel được uống dung dịch bão hòa 30g MgSO4 trong nước. Theo dõi thu hồi mẫu phân của 3-4 lần đi ngoài sau khi tẩy sán. Tiến hành đãi phân trong nước để thu hồi sán trưởng thành [18].

Soi tươi tiêu bản sán trưởng thành qua kính hiển vi vật kính 10x và 40x có gắn vi mét thị kính để đo kích thước và ghi chép các số đo.

Kỹ thuật nhuộm sán trong carmin.

Lấy sán lá nhỏ từ phân, để sán vào hộp lồng và rửa bằng nước thường trong 1/2 - 1 giờ.

Để sán lá lên phiến kính, úp phiến kính khác lên. Lấy chỉ quấn chặt để cho sán thẳng và mỏng ra.

Ngâm vào cồn 70^o trong 30 phút , sau tháo kính giữ sán để trong cồn 70^o đến khi nhuộm.

Để sán vào thuốc nhuộm carmin 5-15 phút đến khi sán có màu mận chín thì bỏ sán vào cồn acid.

Để trong cồn acid vài phút cho đến khi sán có màu hồng hồng. Quan sát bằng lúp để xác định xem các bộ phận bên trong sán đã rõ thì thôi. Nếu chưa rõ thì phải để lại vào thuốc nhuộm.

Làm trong: từ cồn acid chuyển lần lượt sang cồn 80^o rồi 90^o-96^o từ 10-15 phút mỗi loại.

Xong để vào xylen.

Gắn bằng Baume Canada, đậy lá kính con lên trên.

Tiến hành quan sát đặc điểm hình thái, các giác bám, tinh hoàn..., đo đạc các kích thước để định loại sán.

- Cơ sở để xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ bằng phương pháp hình thái học dự trên các đặc điểm được mô tả bởi các tác giả Darwin Murrell [3] và của Phan Thị Vân [4] dựa trên các đặc điểm cơ bản như sau:

+ Đặc điểm hình dạng, kích thước của giác miệng, giác bụng

+ Đặc điểm buồng trứng, tử cung.

+ Đặc điểm và vị trí phân bố của tuyến noãn hoàng.

+ Đặc điểm chi tiết của tinh hoàn.

2.2.1.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng phương pháp hình thái trên cá

- Đối tượng nghiên cứu: Nang ấu trùngSLGN, SLRN thu được trên cá từ địa điểm nghiên cứu.

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu

+ *Thời gian nghiên cứu:* Từ tháng 3/2016 - 12/2017

+ *Địa điểm nghiên cứu:* Xét nghiệm phân tích hình thái tại labo của khoa Ký sinh trùng, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương.

- Phương pháp nghiên cứu

+ *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu mô tả.

+ *Cỡ mẫu:*

Toàn bộ nang ấu trùng trên cá thu được ở địa điểm nghiên cứu

+ *Nội dung nghiên cứu*

Xác định loài nang ấu trùng thu được dựa vào đặc điểm hình thái học

+ *Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu*

Kỹ thuật định loại nang ấu trùng dựa vào đặc điểm hình thái

Sử dụng kỹ thuật tiêu cơ bằng pepsin và axit clohydric theo quy trình của Viện Sốt rét Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương để phát hiện và định loài nang ấu trùng sán trong cá.

Định loại nang nang ấu trùng sán bằng hình thái học dựa trên khoá định loại được mô ta bởi tác giả Phan Thị Vân [4] bao gồm các đặc điểm như

+ Hình dáng nang ấu trùng tròn hay bầu dục,

+ Thành mỏng hay dầy,

+ Hình dạng và kích thước của giác miệng và giác bụng.

+ Đặc điểm của giác bụng sinh dục có gai kích thước to hay nhỏ, phân bố tập trung hay rải rác, có hình dạng chữ S, C hay I,

+ Đặc điểm kích thước tuyến tiết thẳng hay hình chữ S [4].

Mỗi mẫu cá có thể nhiễm 1 đến nhiều loại nang ấu trùng khác nhau, trong đó thường có 1 loại chiếm ưu thế về số lượng. Việc định loại nang ấu trùng được chia làm 2 giai đoạn. Giai đoạn 1: Phân loại thô dựa trên kích thước hình thái ban đầu thông qua kính giải phẫu ở độ phóng đại thấp; Giai đoạn 2: Định loại chi tiết ở kính hiển vi với độ phóng lớn quan sát các đặc điểm hình thái quan trọng của nang ấu trùng.

Trước tiên toàn bộ nang ấu trùng thu được từ mỗi mẫu giữ trong đĩa Petri nhỏ (5cm) được quan sát bằng kính giải phẫu (Olympus CX21), sử dụng kim nhỏ để tách những nang ấu trùng có kích thước, hình thái khác biệt với những nang ấu trùng còn lại. Sử dụng ống hút để hút các nang ấu trùng này, đưa lên lam kính, đậy lamen và quan sát bằng kính hiển vi ở các vật kính 10X, 40X và 100X. Sau đó, những nang ấu trùng còn lại cũng được hút đưa lên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi tương tự ở các vật kính 10X, 40X và 100X.

Dưới kính hiển vi, ở vật kính 10X, 40X, 100X, quan sát kỹ các đặc điểm hình thái cơ bản bao gồm giác miệng, giác bụng, túi bài tiết, răng trên giác bụng hoặc giác miệng…vv. Đo kích thước nang ấu trùng chiều dọc và ngang, kích thước giác miệng, giác bụng (nếu có), đếm số lượng răng trên giác miệng hoặc giác bụng (nếu có)…

Một số trường hợp chưa quan sát rõ được các đặc điểm định loại có thể tiến hành phá nang bằng cách: dùng giấy thấm, rút nhẹ nước ở dưới lamen chứa bào nang ấu trùng để ấu trùng bị ép mỏng hoặc bào nang có thể vỡ, ấu trùng thoát khỏi bào nang có thể giúp quan sát rõ hơn một số đặc điểm định loại. Hoặc lật lamen khỏi lam kính, vừa quan sát dưới kính giải phẫu, vừa dùng 2 kim nhọn để làm vỡ thành bào nang giúp ấu trùng thoát khỏi bào nang.

2.2.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng sinh học phân tử

2.2.2.1. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người bằng sinh học phân tử

- Đối tượng nghiên cứu: Các mẫu phân có kết quả xét nghiệm trứng SLGN, SLRN dương tính (Toàn bộ mẫu phân những người có kết quả xét nghiệm phân dương tính với SLGN, SLRN ở mục tiêu 1).

SLGN, SLRN trưởng thành thu được từ những người xét nghiệm phân (+), sau khi uống thuốc tẩy.

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu

+ *Thời gian nghiên cứu:* Từ tháng 3/2016 - 3/2019

+ *Địa điểm nghiên cứu:*

Xét nghiệm sinh học phân tử tại labo của phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y dược học, Học viện Quân Y.

- Phương pháp nghiên cứu

+ *Thiết kế nghiên cứu:* Nghiên cứu mô tả

+ *Cỡ mẫu:* Toàn bộ trứng và sán trưởng thành của SLGN, SLRN thu được từ những người có xét nghiệm phân (+).

+ *Nội dung nghiên cứu:*

Xác định thành phần loài dựa vào trứng sán: dùng hai chỉ thị phân tử là ITS 2 và cox 1

Sán trưởng thành: ITS 2

+ *Vật liệu nghiên cứu*

Dụng cụ, máy móc phân tích sinh học phân tử

Máy li tâm: Hettich

Máy Master cycler PCR: Eppendorf

Máy li tâm (Biofuge Primo R): Heraeus

Máy chụp gel: UVP Eppendorf

Lò vi sóng: Sanyo

Cân điện tử (electronic balances): Adam

Pippetman: Gilson, Haminlton, Bio-rad

Vortex: OSI Rotolab

Bể ổn nhiệt: Memmert

Khối ổn nhiệt có lắc: Eppendorf

Máy lắc Gyromax 737R: Amerex instrument

Bộ điện di DNA: Labnet

Tủ cấy an toàn sinh học: Nuaire

Tủ ấm: Shelab

Tủ lạnh 0^{o}C, 4 ^{o}C, -20 ^{o}C, -80 ^{o}C: Nuaire

Các hóa chất, sinh phẩm phục vụ phân tích sinh học phân tử

QIAamp DNA stool mini Kit (tách chiết DNA mẫu phân) của hãng QIAGEN, gồm Protein K, ATL buffer, AL buffer, Inhibitex, AW1 buffer, AW2 buffer, Elution Buffer.

QIAamp DNA mini kit (tách chiết DNA mẫu nang ấu trùng): của hãng QIAGEN gồm Protein K, ATL buffer, AL buffer, Inhibitex, AW1 buffer, AW2 buffer, Elution Buffer.

Hóa chất dùng trong PCR

PCR mastermix: Promega

Primer (F+R): IDH

H2O: Promega

Hóa chất trong điện di và soi gel:

Thang chuẩn DNA (50bp-100bp): Thermo

Agarose: Thermo

Loading dye: Thermo

EtBr: Biobasic

Mồi: ITS2: ITS2-F (5-CTT GAACGC ACA TTG CGG CCA TGG G-3) và ITS2-R(5 -GCG GGT AAT CAC GTC TGA GCC GAG G-3) [112].

Cox1: JB3-F (5'-TTT TTT GGG CAT CCT GAG GTT TAT-3') và JB4.5-R (5'-TAA AGA AAG AAC ATA ATG AAA ATG-3') [133].

+ Kỹ thuật xác định loài bằng sinh học phân tử

Kỹ thuật tách DNA của trứng sán trong phân

Mẫu phân lưu trong cồn phẩm được tách DNA theo hướng dẫn của bộ kit QIAamp DNA stool mini Kit (Qiagen) với một số thay đổi nhỏ nhằm tăng khả năng phá hủy vỏ trứng sán như sau:

Ly tâm dịch phân bảo quản trong ethanol 70% ở 3000 rpm, 10 phút.

Hút 200 µl dịch, 1,4ml buffer ASL, vortex đồng nhất hỗn hợp.

Ủ hỗn hợp 95°C, 4 phút. Đặt trên đá 8 phút. Lặp lại bước này thêm 1 lần.

Vortex hỗn hợp 15 giây và ly tâm nhẹ. Ủ hỗn hợp 95^0C, 10 phút.

Ly tâm 14000 rpm, 1 phút. Hút 1,2 ml dịch vào eppendorf 2 ml. Thêm 1 viên Inhibitex vào dịch, vortex trong 1 phút hoặc cho tới khi tan hoàn toàn. Ủ 1 phút, ở nhiệt độ phòng.

Ly tâm 14000 rpm, 3 phút. Dịch được chuyển sang eppendorf 1.5ml, ly tâm 14000 rpm, 3 phút.

Thêm 20 µl protein K , 400µl dịch nổi ở trên, 200µl AL. Ủ 70^0C, 10 phút.

Thêm 200 µl ethanol (96%-100%), vortex 15 giây, ly tâm ngắn. Chuyển dịch sang cột, ly tâm 14000 rpm, 1 phút.

Đặt cột vào tube mới, thêm 500 µl AW1, ly tâm 14000 rpm, 1 phút.

Thêm 500 µl AW2, ly tâm 14000 rpm, 3 phút.

Ly tâm khô 14000 rpm, 1 phút.

Cho 50 µl AE đã ủ 70^0C vào cột, ủ 2 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm14000 rpm, 1 phút, thu dịch. Dịch được bảo quản ở -20^0C cho sử dụng lâu dài.

Quy trình tách DNA của sán trưởng thành bằng QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất

Mẫu sán trưởng thành được sau khi rửa sạch sẽ được cho vào cồn 70^0 và bảo quản ở 4^0C đến khi phân tích.

Cắt ½ sán lá gan nhỏ lấy mẫu tách DNA cho vào ống vào 1 ống Eppendorf 1,5 ml, ghi mã số mẫu.

Thêm 180 µl buffer ATL vào ống 1,5 ml đã có mẫu.

Thêm vào 20 µl Proteinase K, trộn đều và li tâm nhanh

Đặt tube ủ ở nhiệt độ 56^0C/ 900 vòng/phút trong 1 giờ. Li tâm nhanh.

Thêm vào 200 µl buffer AL, trộn đều trong vòng 10 giây.

Đặt tube ủ ở nhiệt độ 70^0C/ 900 vòng/phút trong 10 phút. Li tâm nhanh.

Chuyển dịch nổi vào cột, li tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang tube mới.

Thêm vào 500 µl buffer AW1, li tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang tube mới.

Thêm vào 500 µl buffer AW2, li tâm tốc độ 8000 vòng/phút, chuyển cột sang tube mới.

Li tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút/3 phút.

Đặt cột vào trong ống 1,5 ml, thêm vào 50 µl buffer AE

Đậy nắp tube, để ở nhiệt độ phòng 5 phút, li tâm 14.000 vòng/phút/2 phút.

Mẫu DNA thu được lưu trong nước, để ở -20^{0}C đến khi chạy PCR.

Quy trình phản ứng PCR

Bảng 2. 1: Chu trình nhiệt của phản ứng PCR

Số chu kỳ	**Thời gian**	**Nhiệt độ**	**Giai đoạn**
1 chu kỳ	5 phút	95^{0}C	Biến tính
35 chu kỳ	30 giây	95^{0}C	Biến tính
	30 giây	60^{0}C	Gắn mồi
	45 giây	72^{0}C	Kéo dài
1 chu kỳ	7 phút	72^{0}C	Kéo dài hết các chuỗi
1 chu kỳ	+∞	4^{0}C	Bảo quản mẫu

Rã đông các thành phần phản ứng PCR trên đá vảy. Vortex nhẹ và spin trong 5 giây. Lần lượt thực hiện thao tác pipet cho 25 phản ứng bằng việc chuyển toàn bộ thể tích của Master Mix (250 µl), cặp mồi ITS2 (25 µl), nước (100 µl) vào tube 1.5 ml.

Vortex kỹ và spin trong 5 giây. Thu được hỗn hợp đầy đủ (375 µl) cho25 test (hỗn hợp đầy đủ này nếu không sử dụng hết có thể được chia thành các tube nhỏ 5-10 test để bảo quản -20^{0}C, tránh rã đông quá 3 lần).

Chia lần lượt 15 µl mix vào các PCR tube.

Bổ sung 5 µl mẫu vào các PCR tube, đối chứng âm thay bằng nước khử ion.

Đậy nắp kín (hoặc dán parafin đối với plate), spin trong 5 giây.

Chuyển ngay các ống PCR tube vào máy PCR và bắt đầu chương trình.

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1.2%, 110V, 60 phút. Ngâm

EtBr 30 phút, soi trên máy UV vis.

Tinh sạch sản phẩm PCR: Tinh sạch sản phẩm PCR giúp loại bỏ các chất ức chế phản ứng lai (như các thành phần còn sót lại của phản ứng PCR), qua đó tạo điều kiện lai tốt nhất cho quá trình giải trình tự. Quy trình tinh sạch sản phẩm PCR bằng Bioneer kít như sau:

Bước 1: Thêm PB Buffer vào ống đựng sản phẩm PCR theo tỷ lệ 5:1

Bước 2: Chuyển hỗn hợp lên Binding Column tube, ly tâm 13.000 rpm, 1 phút.

Bước 3: Chuyển Binding Column sang tube mới. Thêm 500µl WB Buffer, ly tâm 13.000 rpm, 1 phút.

Bước 4: Lặp lại bước 3

Bước 5: Ly tâm 13.000 rpm, 1 phút

Bước 6: Chuyển Binding Column sang ống eppendorf 1.5 ml, thêm 30µl Elution Buffer, ủ 5 phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 7: Ly tâm 13.000 rpm, 1 phút, bỏ Binding Column, thu dịch và bảo quản ở -20^{o}C.

Chất lượng của sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng đo nồng độ DNA và điện di.

Kỹ thuật giải trình tự: sản phẩm PCR được gửi đến First BASE Lab Laboratory Sdn Bhdservice (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự tự động theo cả hai hướng, sử dụng các mồi tương tự đã được sử dụng trong PCR. Trình tự đã được đọc trên hệ thống máy giải trình tự gen (phần mềm phân tích di truyền) 3130 XL của ABI (Hãng sản xuất máy giải trình tự của Mỹ). Độ chính xác của dữ liệu được xác định bằng hai hướng giải trình tự.

Kỹ thuật so sánh trình tự: thu được với ngân hàng gen để xác định loài: Sau khi giải trình tự gen, các trình tự được kiểm tra bằng chương trình BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/Blast) để khẳng định trình tự thuộc loài sán.

Xây dựng cây chủng loại phát sinh: Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm Bioedit 7.0 và Mega 7. Sử dụng phần mềm Bioedit để so sánh nuclotide. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên các trình tự thu được

từ mẫu và một số trình tự tham chiếu (thu thập từ ngân hàng gen) bằng phần mềm Bioedit 7.0 và MEGA 7 theo phương pháp Neighbor Joining với giá trị bootstrap (độ tin cậy) 1000 lần lặp lại [99].

2.2.2.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng sinh học phân tử trên cá

- Đối tượng nghiên cứu: Nang ấu trùng sán thu được trên cá từ mục tiêu 1

- Thời gian và địa điểm nghiên cứu

+ *Thời gian nghiên cứu:* Từ tháng 3/2016 - 3/2019

+ *Địa điểm nghiên cứu*

Xét nghiệm sinh học phân tử tại labo xét nghiệm của phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y.

- Phương pháp nghiên cứu

+ Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả.

+ Cỡ mẫu nghiên cứu:

Chọn mẫu đại diện cho nang ấu trùng của tùng loài: dựa vào kết quả định loại bằng hình thái học, chọn 4 mẫu đại diện cho mỗi loài thu được.

+ Nội dung nghiên cứu

Xác định loài nang ấu trùng thu được bằng sinh học phân tử.

+ Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

+ Kỹ thuật tách DNA của nang ấu trùng sán

Mẫu bệnh phẩm được tách DNA theo hướng dẫn của bộ kit QIAamp DNA miniKit (Qiagen, Đức) với một số thay đổi nhỏ nhằm tăng khả năng phá hủy màng nang ấu trùng như sau:

200 µl mẫu, siêu âm 1 phút. Thêm 20 µl protein K, ủ 560C, 30 phút.

Thêm 200 µl buffer AL vào ống eppendorf 1.5 ml, vortex 15 giây, ly tâm ngắn. Ủ hỗn hợp 70o C, 10 phút.

Thêm 200 µl ethanol (96%-100%), vortex 15 giây, ly tâm ngắn.

Chuyển hỗn hợp lên cột, ly tâm 8000 rpm, 1 phút.

Thêm 500 µl AW1, ly tâm 8000 rpm, 1 phút.

Thêm 500 µl AW2, ly tâm 14000 rpm, 1 phút.

Ly tâm 14000 rpm, 1 phút.

Thêm 50 µl buffer AE, ủ 1 phút, nhiệt độ phòng.

Ly tâm 8000 rpm, 1 phút, thu dịch. Dịch được bảo quản ở 40C trước khi sử dụng và -200C trong trường hợp bảo quản lâu dài.

+ Kỹ thuật chạy PCR, tinh sạch sản phẩm, giải trình tự, xây dựng cây phả hệ: tương tự như với mẫu phân, sán trưởng thành. Sử dụng cặp mồi cho vùng ITS2.

2.3. Đạo đức nghiên cứu:

- Nghiên cứu đã thực hiện nghiêm túc các quy định về đạo đức.

- Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng y đức của Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng trung ương.

- Người dân được thông báo trước và giải thích về mục đích, yêu cầu của cuộc điều tra. Có sự đồng ý bằng văn bản từ tất cả các đối tượng nghiên cứu.

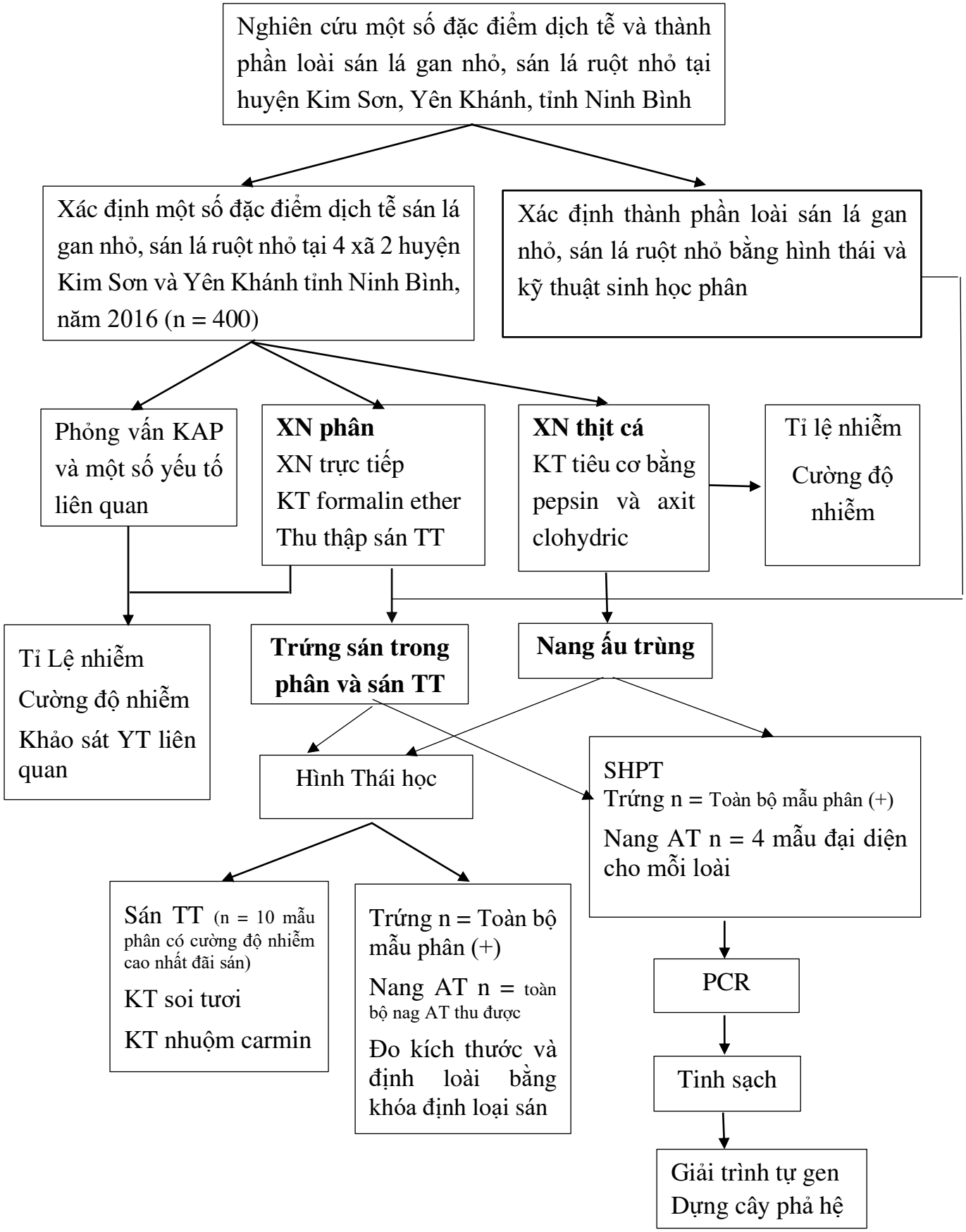
- Người tham gia tự nguyện đồng ý và tự rút lui khi không muốn tham gia. Những người từ chối không hợp tác sẽ không đưa vào nghiên cứu.

- Số liệu, thông tin được đảm bảo tính bí mật, chỉ nhằm mục đích duy nhất phục vụ cho nghiên cứu.

- Các kết quả nghiên cứu, ý kiến đề xuất được sử dụng vào mục đích phục vụ sức khỏe của người dân, không phục vụ mục đích nào khác.

- Tất cả những người có kết quả dương tính với ký sinh trùng được hướng dẫn điều trị tại cơ sở y tế địa phương. Trong trường hợp nhiễm sán lá gan/sán lá ruột nhỏ đã tiến hành cấp thuốc, hướng dẫn điều trị tại trạm theo phác đồ qui định của Bộ Y tế, sau khi điều trị tiến hành lấy phân xét nghiệm kiểm tra lại.

SƠ ĐỒ NGHIÊN CỨU



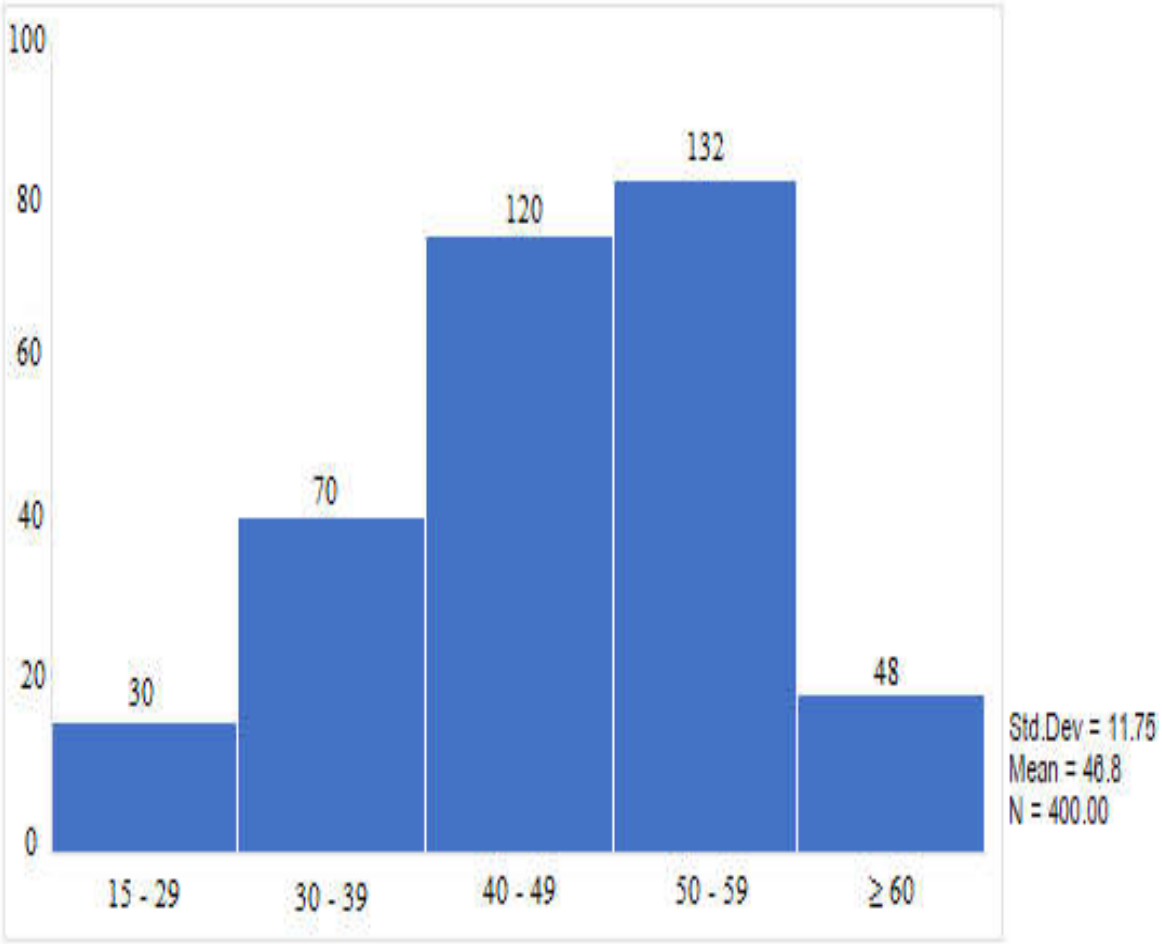
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016.

3.1.1. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

3.1.1.1. Một số đặc điểm về đối tượng nghiên cứu

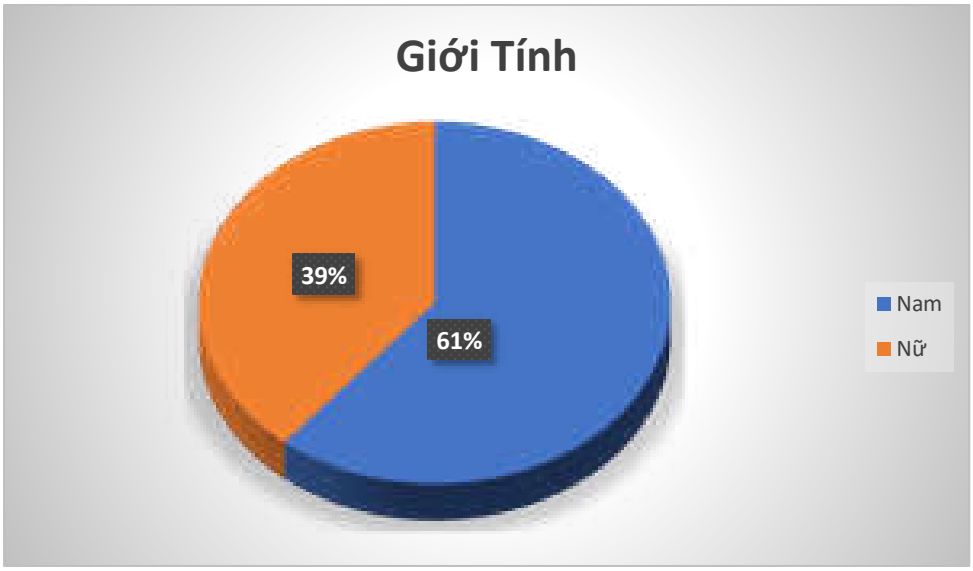
- Tuổi



Hình 3. 1: Đặc điểm tuổi đối tượng nghiên cứu

Nhận xét: Kết quả nghiên cứu tại hình 3.1 cho thấy, trong số 400 người dân tham gia nghiên cứu, tỷ lệ người dân dưới 29 tuổi chiếm tỷ lệ thấp nhất, nhóm tuổi 40 – 59 tuổi chiếm tỷ lệ cao nhất. Tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu là 46,8 ± 11,57 tuổi

- Giới



Hình 3. 2: Phân bố giới đối tượng nghiên cứu

Nhận xét: Trong 400 người làm xét nghiệm thì nam giới 244 người (61,0%) Nữ giới 156 người (39,0%).

- Nghề nghiệp

Bảng 3. 1: Đặc điểm nghề nghiệp, học vấn của đối tượng nghiên cứu

Chỉ tiêu		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Học vấn	Tiểu học	32	8,0
	Trung học cơ sở	195	48,8
	Trung học phổ thông	169	42,3
	Trung học, đại học	4	1
Nghề nghiệp	Nông dân	316	79,0
	Nghề khác	84	21,0

Nhận xét: Đa số đối tượng nghiên cứu là nông dân 316 trường hợp (79%); trình độ học vấn hạn chế, hầu hết mới là trung học cơ sở 195 trường hợp (48,8%); Trung học phổ thông 169 trường hợp (42,3%); Trung học, đại học chiếm 4 trường hợp (1%).

- Điều kiện sống

Bảng 3. 2: Đặc điểm về điều kiện sống của đối tượng nghiên cứu (n=400)

Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nhà có hố xí hợp vệ sinh*	349	87,25
Sống gần sông**	269	67,25
Nhà có ao, hồ	228	57,0
Nhà có chó	286	71,5
Chó vệ sinh vào chỗ riêng	26	6,5
Nhà có mèo	253	63,25
Mèo vệ sinh vào chỗ riêng	7	1,75

Hố xí hợp vệ sinh: 2 ngăn hoặc tự hoại. Gần sông: nhà cách sông < 1 km.

Nhận xét: Đa số nhà có sử dụng hố xí hợp vệ sinh 349 trường hợp (87,25%). Phần lớn người dân sống gần sông 269 trường hợp (67,25%), nhà có ao nuôi cá 228 trường hợp (57%), nhà nuôi chó 286 (71,5%), nuôi mèo 253 (63,25%).

3.1.1.2. Kiến thức, thái độ và thực hành về bệnh sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người.

- Kiến thức

Bảng 3. 3: Tỉ lệ hiểu biết về hành vi liên quan nhiễm sán lá nhỏ (n=400)

Hành vi	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ăn gỏi cá	275	68,8
Ăn rau sống	233	58,3
Qua da	75	18,8
Không biết	11	2,8

Nhận xét: Có 275 trường hợp trả lời nhiễm SLGN, SLRN qua ăn gỏi cá (68,8%); 233 trường hợp trả lời qua ăn rau sống (58,3%); 75 trường hợp cho rằng nhiễm SLGN, SLRN qua da (18,8%) và 11 trường hợp trả lời không biết (2,8%).

Bảng 3. 4: Tỷ lệ đối tượng nghiên cứu đã được truyền thông sán lá nhỏ

Nhóm đối tượng		n	Số được truyền thông	Tỷ lệ (%)	P
Tuổi n = 400	15 - 29	30	11	37,66	0,001
	30 - 39	70	38	53,80	
	40 - 49	120	105	87,88	
	50-59	132	30	22,73	
	≥ 60	48	8	16,67	
Giới n = 400	Nam	244	185	75,63	0,081
	Nữ	156	105	67,60	
Tổng		**400**	**290**	**72,50**	

Nhận xét: Có 72,5% đối tượng đã có thông tin (nghe/ nói) về SLGN, SLRN. Tỷ lệ này khác biệt theo nhóm tuổi có ý nghĩa, chưa khác biệt theo giới.

Bảng 3. 5: Tỉ lệ tuổi, giới biết ăn gỏi cá sẽ nhiễm sán lá nhỏ

Nhóm đối tượng		n	Số biết	Tỷ lệ (%)	P
Tuổi n = 400	15 - 29	30	18	60,00	0,336
	30 - 39	70	45	64,29	
	40 - 49	120	84	70,00	
	50 - 59	132	92	69,70	
	≥ 60	48	36	75,00	
Giới n = 400	Nam	244	166	68,03	0,782
	Nữ	156	109	69,87	

Nhận xét: Tỷ lệ biết ăn gỏi cá nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tăng dần theo nhóm tuổi tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Không có sự khác biệt về tỉ lệ nhiễm giữa hai giới.

Bảng 3. 6: Tỉ lệ người biết ăn cá chín có thể phòng nhiễm sán nhỏ

Nhóm đối tượng		n	Số biết	Tỷ lệ (%)	P
Tuổi n = 400	15 - 29	30	18	60,00	0,336
	30 - 39	70	45	64,29	
	40 - 49	120	84	70,00	
	50 - 59	132	92	69,70	
	≥ 60	48	36	75,00	
Giới n = 400	Nam	244	166	68,03	0,782
	Nữ	156	109	69,87	

Nhận xét: Có 69,3% đối tượng biết ăn chín có thể phòng được sán lá gan nhỏ, tỷ lệ này có xu hướng tăng theo tuổi và ở nữ giới tuy nhiên khác biệt chưa có ý nghĩa.

Bảng 3. 7: Tỉ lệ về người có kiến thức biết giới nào dễ nhiễm sán lá nhỏ

Kiến thức trả lời biết về giới nào dễ nhiễm SLGN, SLRN	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Nam	112	28,0
Nữ	3	0,75
Cả hai giới	274	68,5
Không biết	11	2,75
n	**400**	**100%**

Nhận xét: Có 112 trường hợp trả lời nhiễm của sán lá gan nhỏ gặp nhiều ở nam giới (28%); 3 trường hợp trả lời dễ nhiễm ở nữ gới (),75%); 274 trường hợp trả lời dễ nhiễm ở cả 2 giới (68,5%); và 11 trường hợp trả lời không biết (2,75%).

Như vậy Đa số trường hợp biết là SLGN, SLRN dễ nhiễm ở 2 giới và tỉ lệ ở nam giới nhiều hơn nữ giới.

Bảng 3. 8: Tỉ lệ hiểu biết các tác hại của sán lá nhỏ (n=400)

Tác hại	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Đau bụng	212	53,0
Đau vùng gan	166	41,5
Thiếu máu	66	18,0
Viêm đường mật	60	15,0
Ung thư đường mật	52	13,0
Sỏi mật	54	13,5
Ngứa	41	10,3

Nhận xét: Tác hại của sán lá gan nhỏ được biết nhiều nhất là: Đau bụng với 212 trường hợp trả lời (53%): Đau vùng gan với 166 trường hợp trả lời (41,5%) nhiều hơn so với các tác hại khác và có ý nghĩa thông kê với P < 0,05.

Bảng 3. 9: Kiến thức của người biết về không dùng phân nuôi cá có thể phòng nhiễm sán lá nhỏ

Nhóm đối tượng		n	Số biết	Tỷ lệ (%)	P
Tuổi	15 - 29	30	17	56,67	0,793
	30 - 39	70	41	58,57	
	40 - 49	120	74	61,67	
	50 - 59	132	83	62,88	
	≥ 60	48	33	68,75	
Giới	Nam	244	143	58,61	0,100
	Nữ	156	105	67,31	
Tổng		**400**	**248**	**62,00**	

Nhận xét: Có 248 người (62,0%) trả lời "biết không dùng phân tươi nuôi cá có thể phòng được bệnh". Chưa có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi và giới.

- Thái độ

Bảng 3. 10: Thái độ người dân với bệnh sán lá nhỏ

Thái độ		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Thái độ xử trí nếu biết nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ	Đi khám bác sĩ	387	96,8
	Tự mua thuốc	9	2,2
	Để tự khỏi	4	1,1
Thái độ nếu biết ăn gỏi cá có thể nhiễm bệnh nguy hiểm	Vẫn ăn	13	3,3
	Không ăn	297	74,3
	Giảm số lần ăn	90	22,4

Nhận xét: *Có 387 trường hợp chiếm đa số* (96,8%) chọn: "Đi khám bác sĩ" nếu biết mình bị nhiễm sán. 297 trường hợp trả lời sẽ không sẽ không ăn gỏi cá nếu biết bị nhiễm bệnh nguy hiểm (74,3%).

- Thực hành

Bảng 3. 11: Tỷ lệ người dân có ăn gỏi cá tại địa điểm nghiên cứu

Ăn gỏi / Huyện		Có	Không	Tổng	p_{1-2}
Kim Sơn (1)	Số lượng	154	45	199	0,807
	Tỷ lệ (%)	77,4	22,6	100	
Yên Khánh (2)	Số lượng	139	62	201	
	Tỷ lệ (%)	69,2	30,8	100	
Tổng	Số lượng	293	107	400	
	Tỷ lệ (%)	73,3	26,7	100	

Nhận xét: Có 73,3% trường hợp ăn gỏi cá tại địa điểm nghiên cứu, tỷ lệ ăn gỏi cá giữa hai huyện khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. 12: Tỷ lệ người dân có ăn gỏi cá theo nhóm tuổi, giới (n=400)

Nhóm		n	Số người ăn gỏi	Tỷ lệ (%)	p
Nhóm tuổi	15 – 29	30	18	60,00	0,376
	30 – 39	70	53	75,71	
	40 – 49	120	90	75,00	
	50 – 59	132	94	71,21	
	≥ 60	48	38	79,17	
Giới	Nam	244	209	85,7	< 0,001
	Nữ	156	84	53,8	

Nhận xét: Tỷ lệ ăn gỏi cá ở các nhóm tuổi khác biệt chưa có ý nghĩa. Tỷ lệ nam giới ăn gỏi cá (85,7%) cao hơn nữ giới (53,8%) có ý nghĩa p < 0,001.

Bảng 3. 13: Lý do và địa điểm ăn gỏi cá

Yếu tố		Số lượng	Tỷ lệ (%)
Lý do	Thích ăn	110	27,50
	Uống rượu	107	26,75
	Được chiêu đãi	67	16,75
	Tiếp khách	50	12,50
Nơi ăn	Ở nhà	233	58,25
	Ở quán	124	31,00
	Ở đầm nuôi cá	23	5,75
	Nhà bạn	3	0,75
	Nơi khác	56	14

Nhận xét: Lý do ăn gỏi cá là vì thích ăn (27,5%), lý do ăn gỏi để uống rượu (26,8%). Địa điểm thường ăn gỏi cá: Ở nhà (58,25%); Ở quán (31%).

Bảng 3. 14: Tần suất ăn gỏi cá theo giới

Tần suất	Nam (n=209)		Nữ (n=84)		Tổng	
	n1	%	n2	%	n	%
1 lần /tháng	137	65,55	55	65,48	192	65,53
2 - 3 lần /tháng	53	25,36	28	33,33	81	27,65
≥ 4 lần /tháng	19	9,09	1	1,19	18	6,14
Tổng	209	100,00	84	100,00	20	0,68
p	0,032				293	100

Nhận xét: Đa số người dân được điều tra ăn gỏi cá ăn 1 lần/tháng 192 trường hợp (65,6%); Ăn hàng tuần (≥ 4 lần /tháng) chỉ 6,14%.

Nam giới có xu hướng ăn nhiều lần hơn so với nữ (p<0,05).

Bảng 3. 15: Đặc điểm một số hành vi của đối tượng nghiên cứu (n=400)

Hành vi	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ăn rau sống	318	79,5
Uống nước lã	152	38,0
Vệ sinh xuống ao	40	10,0
Dùng thớt riêng	247	61,75

Nhận xét: Có 318 trường hợp (79,5%) người dân thường xuyên ăn rau sống; 152 trường hợp thường xuyên uống nước lã (38%) và 40 trường hợp (10%) vẫn đi vệ sinh đại tiện trực tiếp xuống ao.

3.1.1.3. Tỷ lệ, cường độ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

Bảng 3. 16: Tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của đối tượng nghiên cứu

Huyện \ Nhiễm sán		Dương tính	Âm tính	Tổng	p_{1-2}
Kim Sơn (1)	Số lượng	40	159	199	0,861
	Tỷ lệ (%	20,1	79,9	100	
Yên Khánh (2)	Số lượng	38	163	201	
	Tỷ lệ (%)	18,9	81,1	100	
Tổng	Số lượng	78	322	400	
	Tỷ lệ (%)	19,5	80,5	100	

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm sán tại địa điểm nghiên cứu là 19,5%, tỷ lệ nhiễm ở Kim Sơn là 20,1%; ở Yên Khánh là 18,9%; Sự khác biệt tỉ lệ nhiễm giữa hai huyện không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. 17: Tỉ lệ nhiễm sán lá nhỏ ở người theo nhóm tuổi

Nhóm tuổi	n	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
15 – 29	30	5	16,67	0,841
30 – 39	70	13	18,57	
40 – 49	120	22	18,33	
50 – 59	132	30	22,73	
≥ 60	48	8	16,67	

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm sán có xu hướng tăng theo nhóm tuổi, cao nhất ở nhóm tuổi 50–59. Sự khác biệt tỷ lệ nhiễm sán giữa các nhóm tuổi chưa có ý nghĩa thống kê

Bảng 3. 18: Tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ ở người theo giới

Huyện/ Giới		n	Số nhiễm	Tỉ lệ (%)	P
Kim sơn	Nam	112	31	27,68	0,004
	Nữ	87	9	10,34	
Yên khánh	Nam	132	34	25,76	0,001
	Nữ	69	4	5,80	
Chung	Nam	244	65	26,6	< 0,001
	Nữ	156	13	8,3	

Nhận xét: Thực hiện xét nghiệm phân của 400 người dân 2 huyện cho thấy, tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của nam giới cao hơn nữ giới gấp 3,99 lần, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,001.

Bảng 3. 19: Tỷ lệ nhiễm lá nhỏ ở người theo nghề nghiệp (n=400)

Nhiễm sán / Nghề nghiệp		Có	Không	Tổng	p
Nông dân	Số lượng	60	256	316	0,626
	Tỷ lệ (%)	19,0	81,0	100	
Nghề khác	Số lượng	18	66	84	
	Tỷ lệ (%)	21,4	78,6	100	

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm sán ở nông dân (19,0%), các nghề khác (21,4%) khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Bảng 3. 20: Tỷ lệ nhiễm lá nhỏ ở người theo trình độ học vấn (n=400)

Học vấn	Số lượng	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
Tiểu học (1)	32	11	34,38	p_{1-2}=0,024
Trung học cơ sở (2)	195	31	15,90	p_{1-3}=0,001
Trung học phổ thông (3)	169	18	10,65	p_{2-3}=0,191
Trung học, đại học (4)	4	0	0	

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm sán ở người có trình độ tiểu học cao hơn người có trình độ trung học cơ sở trở lên (p < 0,05).

Bảng 3. 21: Cường độ nhiễm sán lá nhỏ ở đối tượng nghiên cứu

Nhóm		**n (%)**	**Trung bình** (Trứng/gam phân, Mean ±SE)	**p**
Toàn bộ		78 (100)	517,06 ± 124.9455	
Mức độ nhiễm	Nhẹ	68 (87,17)		
	Trung bình	10 (12,83)		
	Nặng	0 (0)		
Huyện	Kim Sơn	40	723,00 ± 231.5450	0,194
	Yên Khánh	38	396,84 ± 75.6782	

Nhận xét: Cường độ nhiễm sán trung bình chung 2 huyện là 517,06 (trứng/gam phân). Kim sơn 723,00 (trứng/gam phân); Yên Khánh 396,84 (trứng/gam phân. Sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Mức độ nhiễm: Nhẹ 68 trường hợp (87,17%); Trung bình 10 trường hợp (12,83%); Nhiễm nặng không có trường hợp nào.

Bảng 3. 22: Cường độ nhiễm sán lá nhỏ theo giới (n=78)

Giới	**n**	**Cường độ nhiễm trung bình** (Trứng/gam phân)	**P**
Nam	65	618,46 ± 1199,98	0,043
Nữ	13	292,31 ± 194,17	

Nhận xét: Cường độ nhiễm trung bình ở nam 618,46 (trứng/gam phân) cao hơn ở nữ 292,31 (trứng/gam phân) có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

Bảng 3. 23: Cường độ nhiễm trung bình theo nhóm tuổi (n=78)

Nhóm		n	Cường độ nhiễm (Trứng/gam phân)	p
Nhóm tuổi	15 – 29	5	560,00 ± 689,35	0,437
	30 – 39	13	264,62 ± 164,55	
	40 – 49	22	458,18 ± 545,49	
	50 – 59	30	853,33 ± 1665,10	
	≥ 60	8	260,00 ± 177,60	

Nhận xét: Cường độ nhiễm sán trung bình có xu hướng tăng theo tuổi nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3. 24: Cường độ nhiễm trung bình theo nghề nghiệp (n=78)

Nghề nghiệp	n	Cường độ nhiễm (Trứng/gam phân)	P
Nông dân	60	633,33 ± 1235,98	0,207
Nghề khác	18	260,31 ± 141,42	

Nhận xét: Cường độ nhiễm trung bình ở nông dân và người làm nghề khác khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê (p > 0,05).

Bảng 3. 25: Cường độ nhiễm trung bình theo trình độ học vấn (n=400)

Học vấn	n	Cường độ nhiễm (Trứng/gam phân)		p
Tiểu học (1)	11	1170,91	± 1216,02	P_{1-2}=0,003
Trung học cơ sở (2)	31	372,90	± 414,07	P_{1-3}=0,009
Trung học phổ thông (3)	18	293,33	± 452,96	P_{2-3}=0,534

Nhận xét: Cường độ nhiễm sán trung bình ở người có trình độ tiểu học thấp hơn người có trình độ trung học cơ sở và trung học phổ thông (p < 0,05).

3.2.1.4. Một số yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

Bảng 3. 26: Liên quan giữa ăn gỏi cá với nhiễm sán lá nhỏ

Ăn gỏi \ Nhiễm sán		Có nhiễm	Không nhiễm	Tổng	p	OR (CI 95%)
Có	Số lượng	73	220	293	< 0,001	6,769 (2,655 – 17,259)
	Tỷ lệ (%)	24,9	75,1	100		
Không	Số lượng	5	102	107		
	Tỷ lệ (%)	4,7	95,3	100		

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn gỏi cá (24,9%) cao hơn so với người không ăn gỏi cá (4,7%). Người ăn gỏi cá có nguy cơ nhiễm sán cao hơn 6,8 lần so với người không ăn gỏi cá (OR = 6,769; p < 0,001).

Bảng 3. 27: Liên quan giữa tần suất ăn gỏi cá với nhiễm sán lá nhỏ

Số lần ăn	n	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
Không ăn (1)	107	5	4,67	$p_{1-2;3;4} < 0,05$
1 lần /tháng (2)	192	43	22,40	$p_{2-3} > 0,05$; $p_{2-4} < 0,05$
2 – 3 lần /tháng (3)	81	21	25,93	$P_{3-4} < 0,05$
≥ 4 lần/tháng (4)	20	9	45,00	$p_{1;2;3;4} < 0,05$

Nhận xét: Tần suất ăn gỏi cá có liên quan đến tỷ lệ nhiễm sán.

Tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn gỏi cá nhiều lần (≥ 4 lần/tháng; 45,00%) cao hơn có ý nghĩa so với người ăn ít lần hơn (p<0,05).

Bảng 3. 28: Liên quan giới và tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ

Huyện/ Giới		Nhiễm	Không nhiễm	Tổng	OR (CI95%)	p
Kim sơn	Nam	81	31	112	3,32 (1,48 – 7,42)	0,004
	Nữ	78	9	87		
Yên khánh	Nam	98	34	132	4,44 (1,51 – 13,03	0,001
	Nữ	65	4	69		
Chung n = 400	Nam	179	65	244	3,99 (2,12-7,54)	< 0,001
	Nữ	143	13	156		

Nhận xét: Kết quả cho thấy ở cả 2 huyện tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của nam giới đều cao hơn nữ giới; tỷ lệ nhiễm chung cả hai huyện cao gấp 3,99 lần (26,6% so với 8,3%; OR 3,99; CI95% 2,12- 7,54), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,001).

Bảng 3. 29: Liên quan giới, ăn gỏi cá và nhiễm sán lá nhỏ

Ăn gỏi cá/ Giới		Nhiễm	Không nhiễm	Tổng	OR (CI95%)	p
Có ăn gỏi cá	Nam	62	147	209	2,799 (1,390 – 5,636)	0,003
	Nữ	11	73	84		
Không ăn gỏi cá	Nam	3	32	35	3,281 (0,522 – 20,607	0,196
	Nữ	2	70	72		
Chung n = 400	Nam	65	179	244	3,99 (2,12-7,54)	<0,001
	Nữ	13	143	156		

Nhận xét: Kết quả cho thấy, ở những người không ăn gỏi cá, tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của nam giới và nữ giới khác biệt chưa có ý nghĩa, tuy nhiên ở người ăn gỏi cá, tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ của nam giới cao hơn nữ giới 2,799 lần, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,01).

Bảng 3. 30: Liên quan giữa nếp sống vệ sinh với nhiễm sán

Hành vi \ Nhiễm sán		Có nhiễm	Không nhiễm	p	OR (CI 95%)
Ăn rau sống n=400	Có	64	254	0.071720	1,224 (0,647 - 2,315)
	Không	14	68		
Uống nước lã	Có	33	119	0.457125	1,251 (0,757 – 2,069)
	Không	45	203		
Vệ sinh xuống ao	Có	10	30	0.474531	1,431 (0,668 – 3,069)
	Không	68	292		
Dùng thớt riêng	Không	28	125	0.728848	0,883 (0,528 – 1,476)
	Có	50	197		

Nhận xét: Các hành vi: Ăn rau sống; Uống nước lã; Vệ sinh xuống ao và dùng thớt riêng không liên quan tới nhiễm sán.

Bảng 3. 31: Liên quan giữa nuôi chó, mèo với nhiễm sán

Nuôi chó, mèo \ Nhiễm sán		Có nhiễm	Không nhiễm	p	OR (CI 95%)
Nhà có chó	Có	57	229	0,838	1,102 (0,633 – 1,921)
	Không	21	93		
Chó vệ sinh vào chỗ riêng (n=286)	Không	53	207	0,726	1,408 (0,465 – 4,261)
	Có	4	22		
Nhà có mèo	Có	48	205	0,827	0,913 (0,549 – 1,520)
	Không	30	117		
Mèo vệ sinh vào chỗ riêng (n=253)	Không	47	199	0,866	1,417 (0,167 – 12,053)
	Có	1	6		

Nhận xét: Nhà có chó/mèo; chó/mèo không vệ sinh vào chỗ riêng không tăng nguy cơ nhiễm sán.

Bảng 3. 32: Liên quan giữa điều kiện sống với nhiễm sán

Điều kiện \ Nhiễm sán		Có nhiễm	Không nhiễm	p	OR (CI 95%)
Nhà có hố xí hợp vệ sinh*	Không	15	36	0,084	1,892 (0,976 - 3,664)
	Có	63	286		
Sống gần sông**	Có	57	212	0,591	1,408 (0,812 - 2,443)
	Không	32	140		
Nhà có ao, hồ	Có	46	182	0,791	1,106 (0,669 - 1,827)
	Không	32	140		

Nhận xét: Chưa thấy nguy cơ tăng nhiễm sán ở nhà không có hố xí hợp vệ sinh, sống gần sông hay có ao, hồ.

3.1.2. Đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá

3.1.2.1. Một số đặc điểm về cá nghiên cứu

Bảng 3. 33: Loại cá thường được người dân sử dụng ăn gỏi

Loại cá	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Cá mòi	249	62,25
Cá mè	211	52,75
Cá chép	139	34,75
Cá trắm	128	32,00
Cá rô phi	117	29,25
Cá trôi	102	25,50
Cá diếc	26	6,50
Nhiều loại cá	275	68,75

Nhận xét: Các loài cá thường được sử dụng ăn gỏi cá là: Cá mòi 249 trường hợp (62,25%); Cá mè 211 trường hợp (52,75%); Cá chép 138 trường hợp (34,5%); Cá trắm 128 trường hợp (32%); Cá trôi 102 trường hợp (25,5%); Cá diếc 26 trường hợp (6,5%). Và đa số là dùng nhiều loại cá 275 trường hợp (68,7%)...

Bảng 3. 34: Nguồn gốc cá dùng để ăn gỏi

Nguồn cá	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Ao nuôi	272	68,00
Ao tự nhiên	192	48,00
Cá sông	106	26,50
Nguồn khác (biển, đầm)	28	7,00
Không biết	18	4,50

Nhận xét: Đa số người dân ăn cá từ ao nuôi 272 trường hợp (68,0%); Ăn cá từu ao tự nhiên 192 trường hợp (48,0%); Ăn cá sông ít hơn 106 trường hợp (26,5%); Ăn cá ở biển, đầm ít nhất 28 trường hợp (7%)...

Bảng 3. 35: Kích thước cá thu được tại địa điểm nghiên cứu

Loài cá	Số cá xét nghiệm	Chiều dài (cm)		Trọng lượng (g)	
		Nhỏ nhất – lớn nhất	Trung bình	Nhỏ nhất– lớn nhất	Trung bình
Mè	87	24 – 41,5	30,58	106,15 – 808,08	309,38
Trôi	53	20 - 29	24,47	77,25 – 240,0	154,24
Trắm	51	13,5 – 24,0	17,35	27,9 – 145,5	62,58
Chép	52	9 - 21	13,8	20,0 – 250,0	78,12
Rô phi	52	12 – 22	17,43	40,0 – 250,0	136,0
Mòi	50	13 – 17,3	14,65	19,01 – 54,76	29,95
Tổng	345	9 – 41,5	32,5	19,01 – 808,08	147,58

Nhận xét: Nghiên cứu đã xét nghiệm 345 cá thuộc 6 loài khác nhau. Khích thước cá từ 9cm – 41,5 cm; trọng lượng từ 19g – 808g.

3.1.2.2. Tỷ lệ, cường độ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá

Bảng 3. 36: Tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán trên cá

Loài cá	Số xét nghiệm	Số nhiễm nang ấu trùng sán		Giá trị p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Mè (1)	87	58	66,7	(1-3) > 0,05
Trôi (2)	53	8	15,1	(3-4;1) > 0,05
Trắm (3)	51	40	78,4	(2-4;5) < 0,05
Chép (4)	52	45	86,5	(2-3;5) < 0,05
Rô phi (5)	52	1	1,9	(1-2;5) < 0,05
Mòi	50	0	0	(2-5) > 0,05
Tổng	345	152	44,1	

Nhận xét: Tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng 44,1%. Cả 5 loài cá nước ngọt đều nhiễm nang ấu trùng. Tỉ lệ nhiễm cao nhất: Cá chép (86,5%); Cá trắm (78,4%); Cá mè (66,7%). Cá mòi không nhiễm nang ấu trùng sán.

Bảng 3. 37: Cường độ nhiễm nang ấu trùng sán trong cá nước ngọt (nang ấu trùng/gam cá xét nghiệm)

Loài cá	Số cá XN	Số nang sán Trung bình của số gam cá xn của từng loài cá	Độ lệch chuẩn	Giá trị p
Mè (1)	87	0,1529	0,4056	(1-2) > 0,05
Trôi (2)	53	0,0585	0,3443	(1-3;4) < 0,001
Trắm (3)	51	6,3769	11,8058	(1-5) < 0,01
Chép (4)	52	0,4677	0,5706	(2-3; 4) < 0,001
Rô phi (5)	52	0,0004	0,0028	(2-5) > 0,05
Tổng	295	1,2406	5,4208	(3-4;5) < 0,01
				(4;5) < 0,01

Nhận xét: Mật độ nang ấu trùng sán lá nhỏ là 1,24 nang ấu trùng/gam cá; Cao nhất ở cá trắm 6,38 nang ấu trùng/gam cá, thấp nhất là cá trôi 0,56 nang ấu trùng/gam cá.

3.2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử.

3.2.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

Hình 3. 3: Hình ảnh trứng sán lá nhỏ trong phân

Nhận xét: Quan sát hình dạng trứng sán lá nhỏ trong phân bằng vật kính 10 sau đó chuyển sang vật kính 40 (khoảng cách giữa 2 vạch là 1 µm) cho thấy một số đặc điểm về hình thái học của trứng như sau:

+ Trứng có hình bầu dục, hơi nhỏ hơn ở một đầu, giống hình hạt vừng;

+ Vỏ trứng mỏng, bề mặt vỏ trứng nhìn không rõ thô ráp hay trơn nhẵn;

+ Đầu thóp nhỏ có nắp và có vai nhô cao rõ ràng bao quanh nắp;

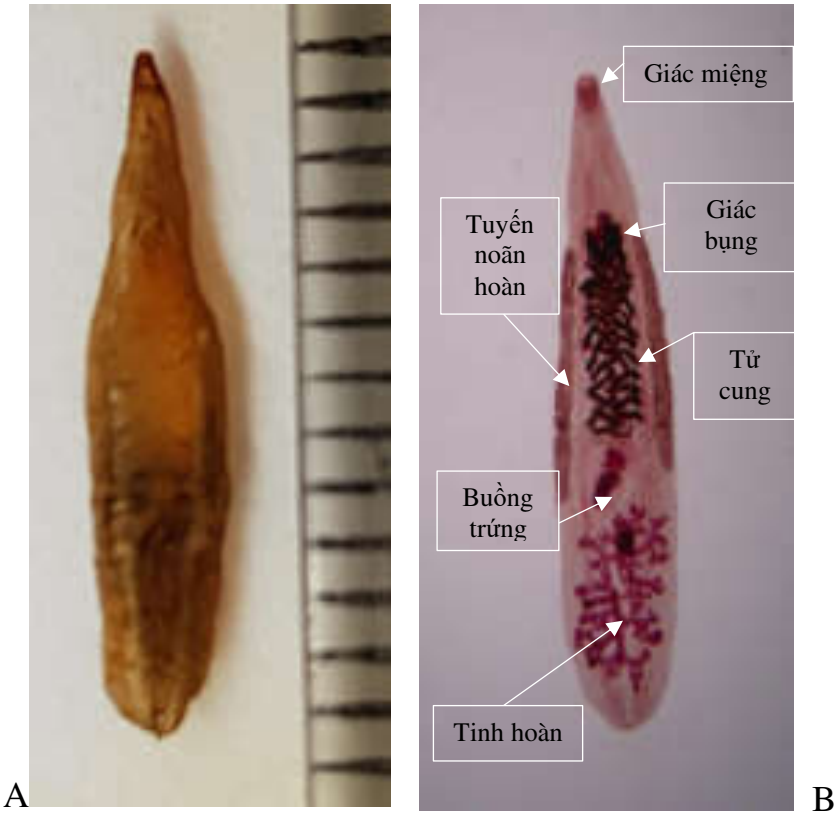
+ Có một núm nhỏ (gai, knob) hình dấu phẩy ở đầu to hơn bên kia;

+ Trong trứng có hình ảnh phôi

Bảng 3. 38: Kích thước trung bình trứng sán lá nhỏ trong phân

Chỉ tiêu	Trung bình	SD
Chiều dài (µm)	28,6	2,7
Chiều rộng (µm)	16,3	2,3
Dài/rộng	1,76	0,8

Nhận xét: Kích thước trứng sán lá nhỏ thu được trong phân phù hợp với trứng sán *C. sinensis* và trứng sán lá ruột nhỏ.



Hình 3. 4: Hình ảnh sán trưởng thành

(Hình A sán tươi chưa nhuộm, Hình B sán nhuộm carmine)

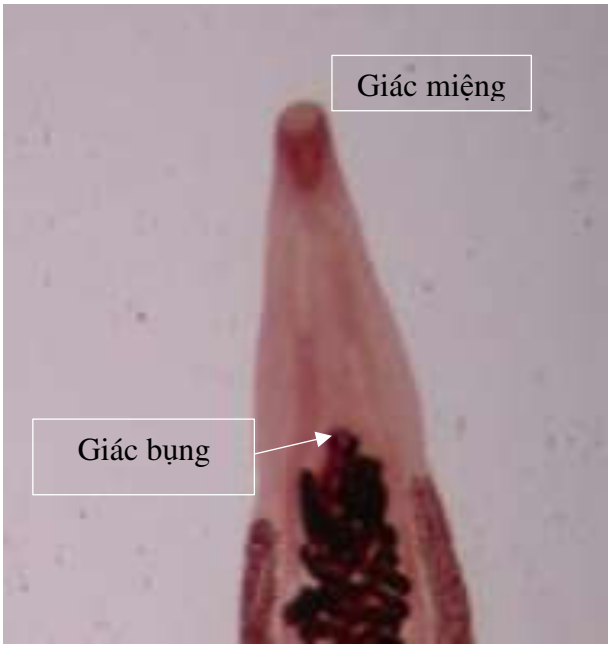
- Kích thước cơ thể: 12-13 mm x 2,5-2,8 mm
- Thân màu nâu
- Cơ thể sán thuôn dẹt và mảnh dài, phần trước hẹp, sau tù.
- Giác miệng ở đầu thân, giác bụng nằm ở phần ba trước cơ thể.
- Hầu được kế tiếp bằng thực quản.
- Hai nhánh ruột kéo dài về mút sau cơ thể.
- Hai tinh hoàn phân nhánh; một nằm ở phần trước một ở phần sau cơ thể.
- Ống bài tiết thẳng
- Tuyến noãn hoàng nằm bên ngoài 2 nhánh ruột.
- Buồng trứng nằm ngay phía trên tinh hoàn.
- Tử cung phát triển, gấp khúc nhiều lần, nằm ở khoảng giữa buồng trứng và giác bụng, chứa đầy trứng

  Những đặc điểm hình thái trên phù hợp với hình ảnh của sán lá gan nhỏ.

Bảng 3. 39: Kích thước trung bình sán lá gan nhỏ trưởng thành trong phân (n = 36)

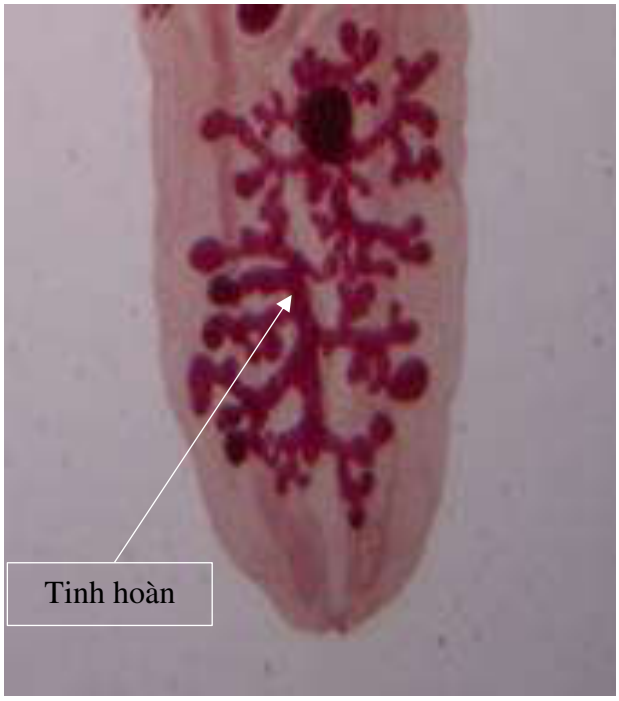
Chỉ tiêu	Trung bình	SD
Chiều dài (mm)	13,2	1,6
Chiều rộng (mm)	2,8	0,4
Giác miệng (µm)	186	23
Giác bụng (µm)	167	21

Nhận xét: Kích thước sán lá nhỏ thu được trong phân trung bình 2,8 x 13,2 mm lớn hơn 1cm phù hợp với sán lá gan nhỏ *C. Sinensis* (SLRN kích thước thường nhỏ hơn 1cm); giác miệng lớn hơn giác bụng.



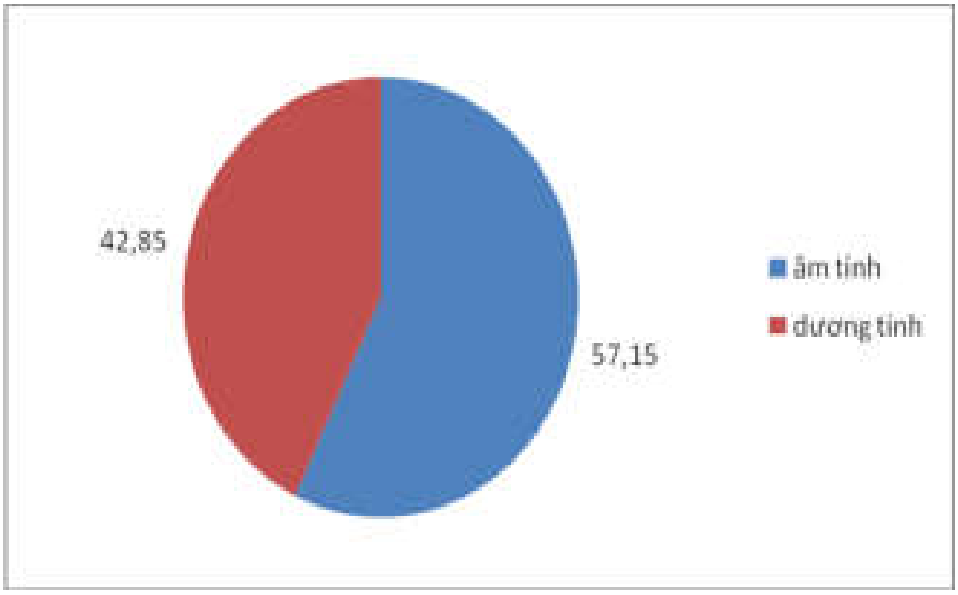
Hình 3. 5: Hình ảnh giác miệng và giác bụng sán lá gan nhỏ trưởng thành

Nhận xét: Có hai giác bám là giác miệng (OS) và giác bụng (VS).



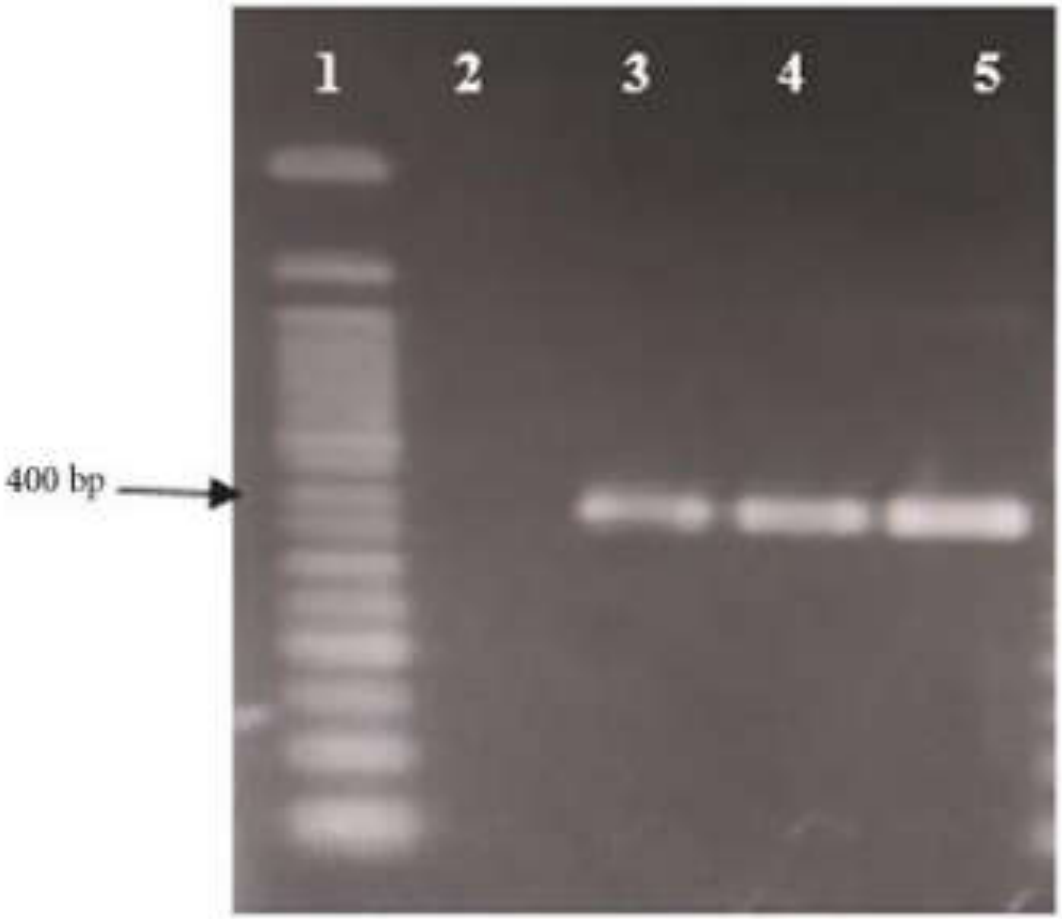
Hình 3. 6: Hình ảnh tinh hoàn của sán trưởng thành

Nhận xét: Tinh hoàn chia nhánh nhỏ hình cành cây, là đặc điểm hình thái quan trọng của loài sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.



Hình 3. 7: Tỷ lệ mẫu phân cho sản phẩm PCR (n=70)

Nhận xét: (Có 78 mẫu phân nhưng chỉ có 70 mẫu đủ phân để tách DNA và chạy PCR). Tỷ lệ mẫu cho sản phẩm PCR là 42,85%.



Hình 3. 8: Hình ảnh điện di sản phẩm PCR trong mẫu phân

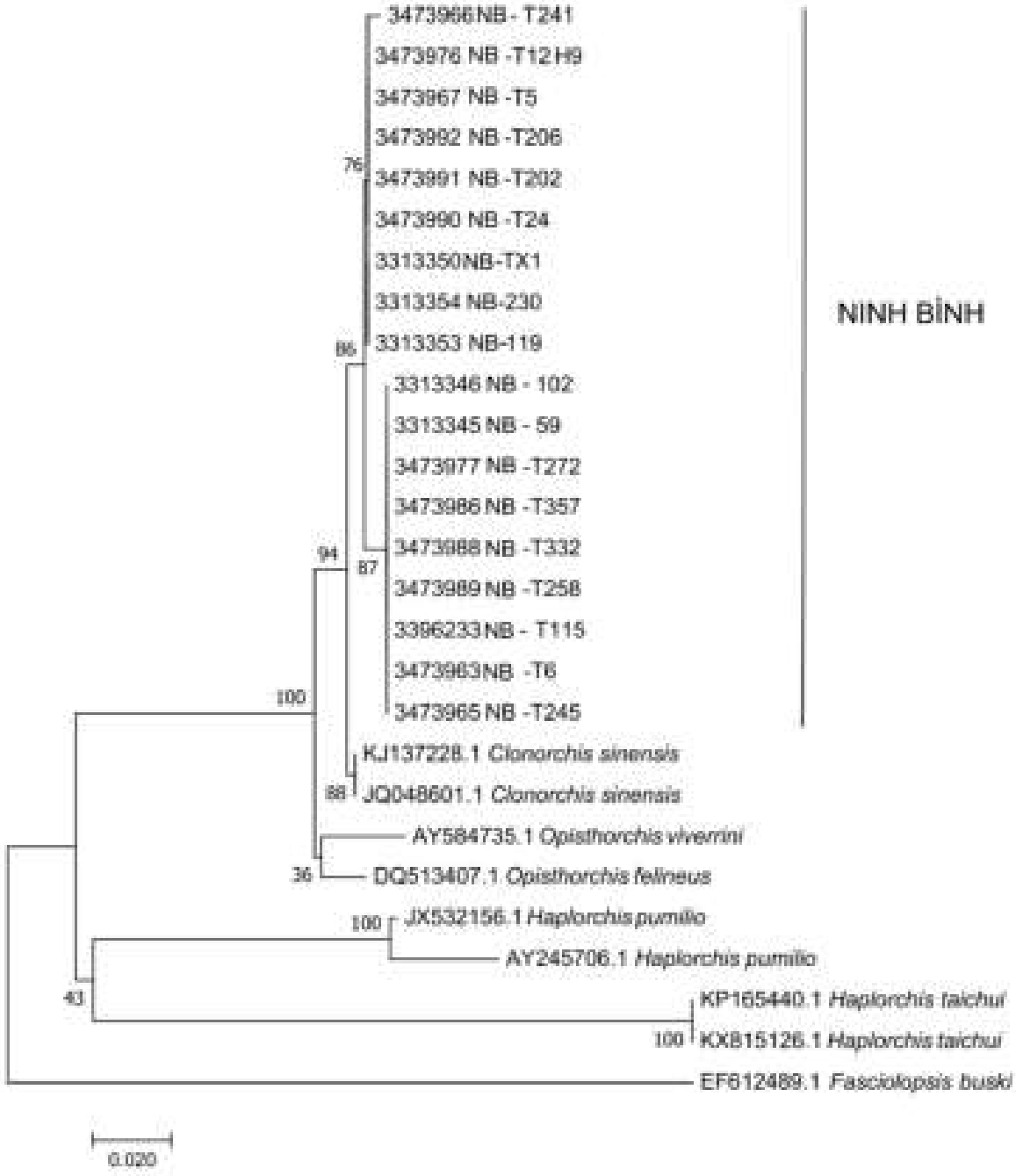
Band 1: 50 bp DNA marker), band 2: chứng âm, band 3-5: mẫu.

Nhận xét: Hình ảnh điện di cho sản phẩm có kích thước khoảng 400 bp.

Bảng 3. 40: Một số chuỗi gen ITS 2đã được đăng ký trên ngân hàng gen

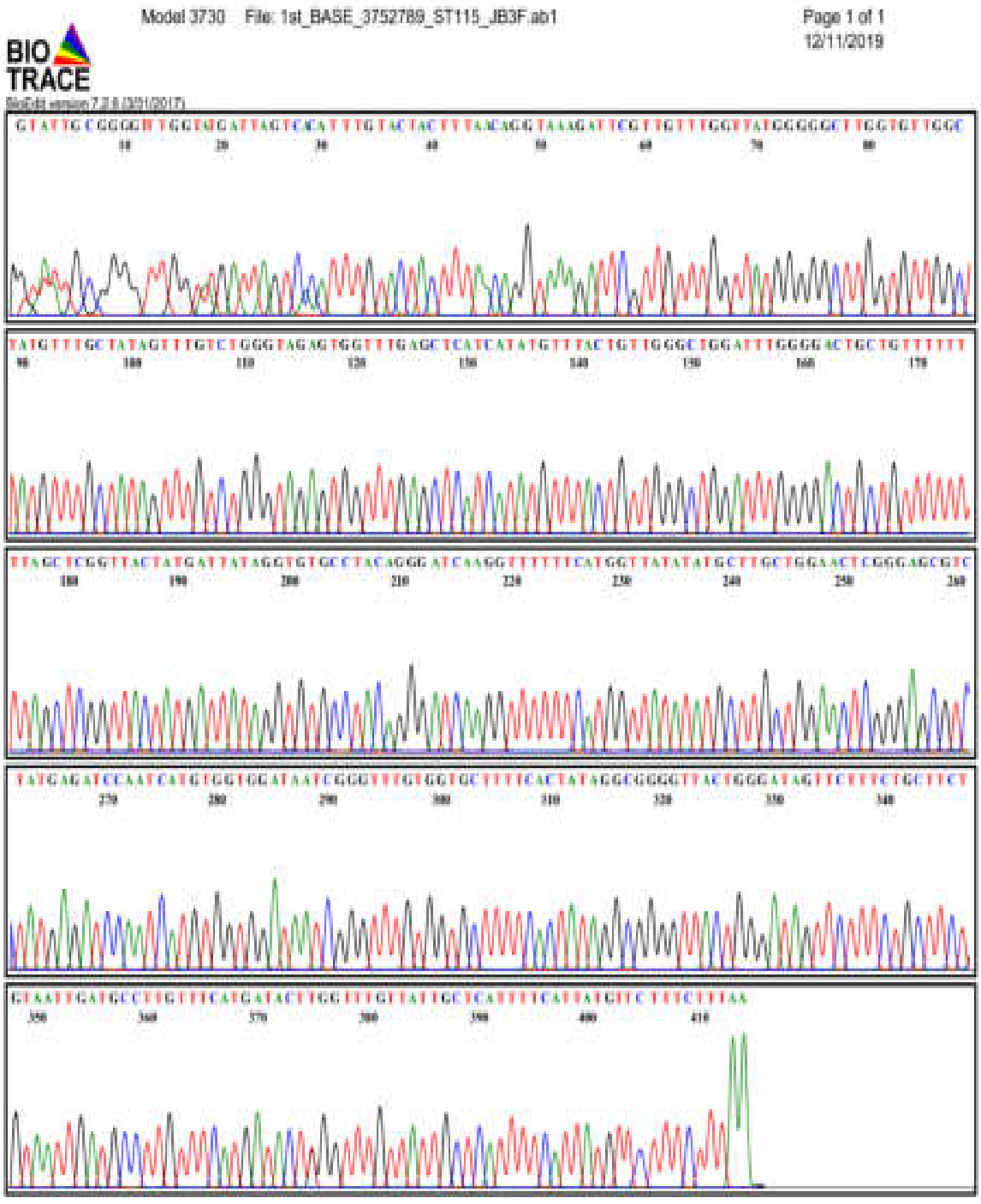
Mã mẫu	Loài	Mã trên ngân hàng gen
59-NB	*Clonorchis sinensis*	MN128615
102-NB	*Clonorchis sinensis*	MN128616
119-NB	*Clonorchis sinensis*	MN128617
TX1-NB	*Clonorchis sinensis*	MN128618

Nhận xét: Kết quả cho thấy tất cả các mẫu sán cho kết quả tách chiết DNA ở người đều là sán lá gan nhỏ *C. sinensis*



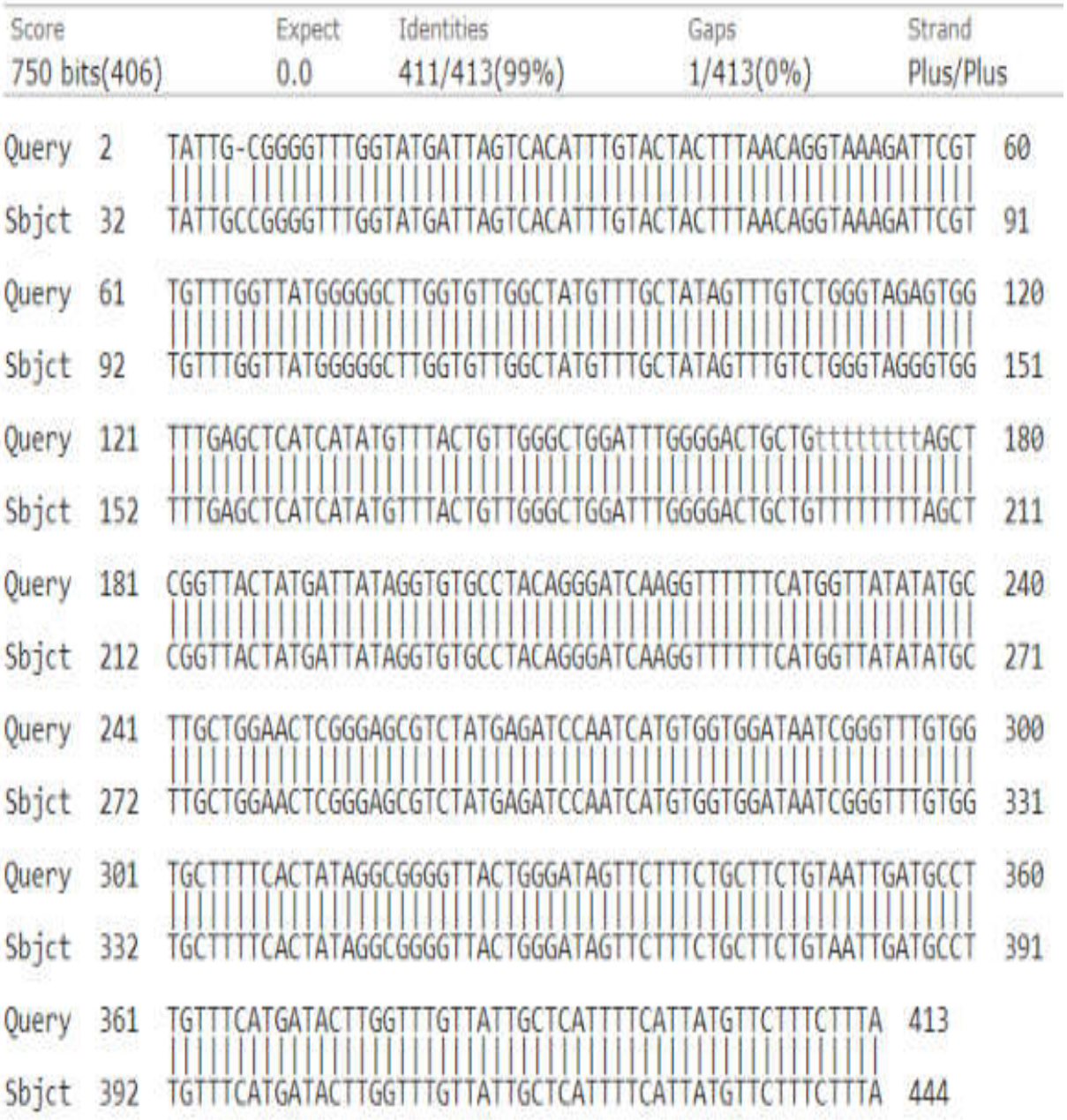
Hình 3. 9: Cây phả hệ trứng sán lá nhỏ ở người dựa vào ITS2

Nhận xét: Cây phả hệ sán lá nhỏ được xây dựng dựa vào chuỗi ITS2 trong luận án và một số chuỗi từ GenBank (KJ137228, JQ048601, AY584735, DQ513407, JX532156, AY245706, KP165440, EF6124489) tất cả các mẫu cho kết quả tách chiết DNA ở người đều là sán *C. sinensis*.



Hình 3. 10: Hình ảnh chuỗi gen cox1 của mẫu 115

Nhận xét: Chuỗi gen cox1 của sán lá nhỏ có kích thước > 410 bp.



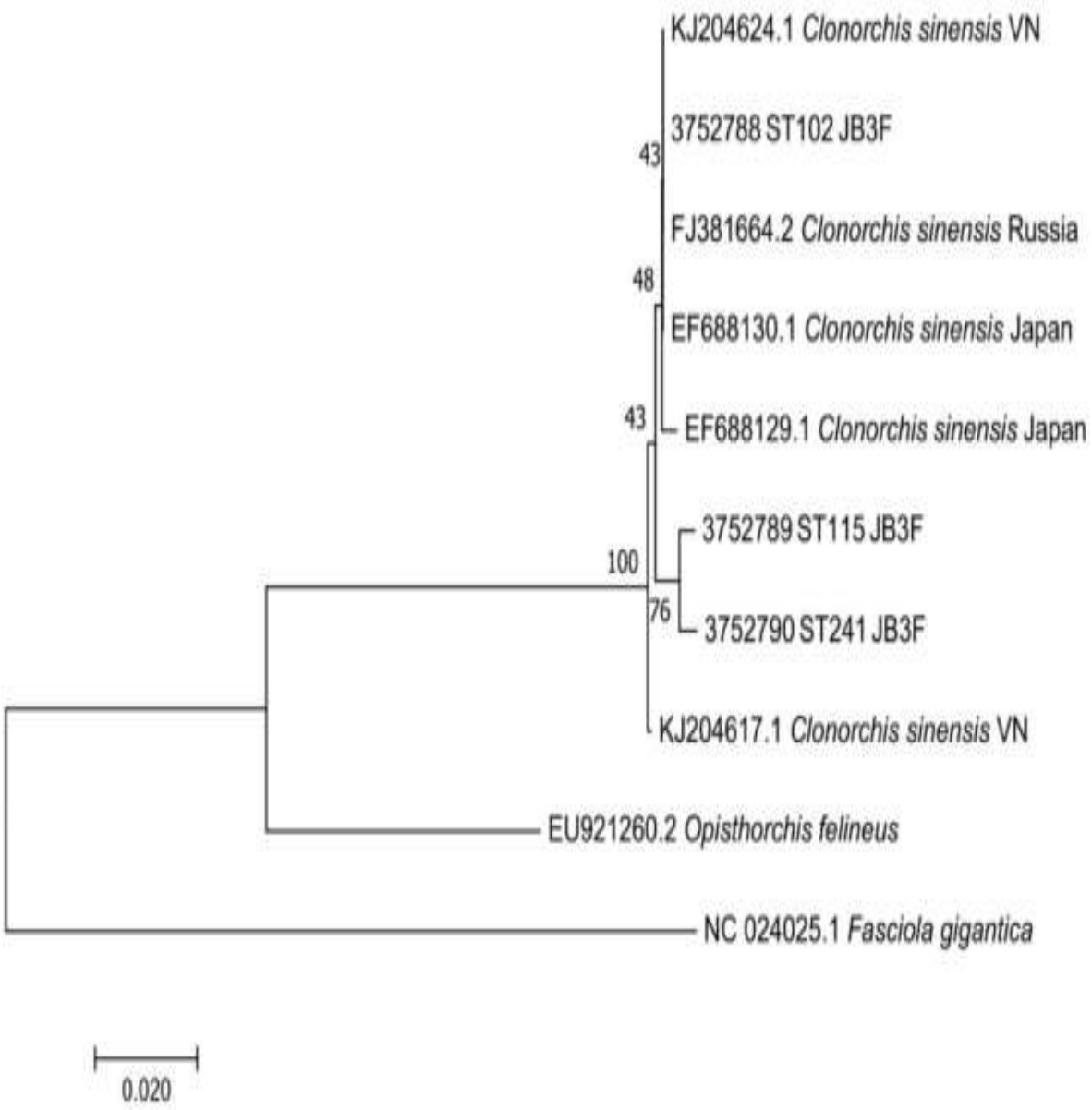
Hình 3. 11: Kết quả so sánh CoxI mẫu 115 với chuỗi EU652407 trên ngân hàng gen

Nhận xét: Chuỗi gen cox1 của mẫu 115 trùng hợp 411/413 = 99,52% với chuỗi EU652407, có nguồn gốc từ Việt Nam, chứng tỏ mẫu 115 là sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

Bảng 3. 41: Mức độ tương đồng mẫu 115 với một số chuỗi gen

Số TT	Tên chuỗi	Nguồn	Mức độ tương đồng (%)	Tên loài
1	EU652407	Việt Nam	99,52	*C. sinensis*
2	MN116478	Nga	99,01	*C. sinensis*
3	MN116477	Nga	99,01	*C. sinensis*
4	MN116476	Nga	99,01	*C. sinensis*
5	MN116475	Nga	99,01	*C. sinensis*
6	KY564177	Korea	99,01	*C. sinensis*
7	KJ204622	Việt Nam	99,01	*C. sinensis*
8	KJ204600	Việt Nam	99,01	*C. sinensis*
9	KJ204582	Nga	99,01	*C. sinensis*
10	KJ204590	Nga	99,01	*C. sinensis*

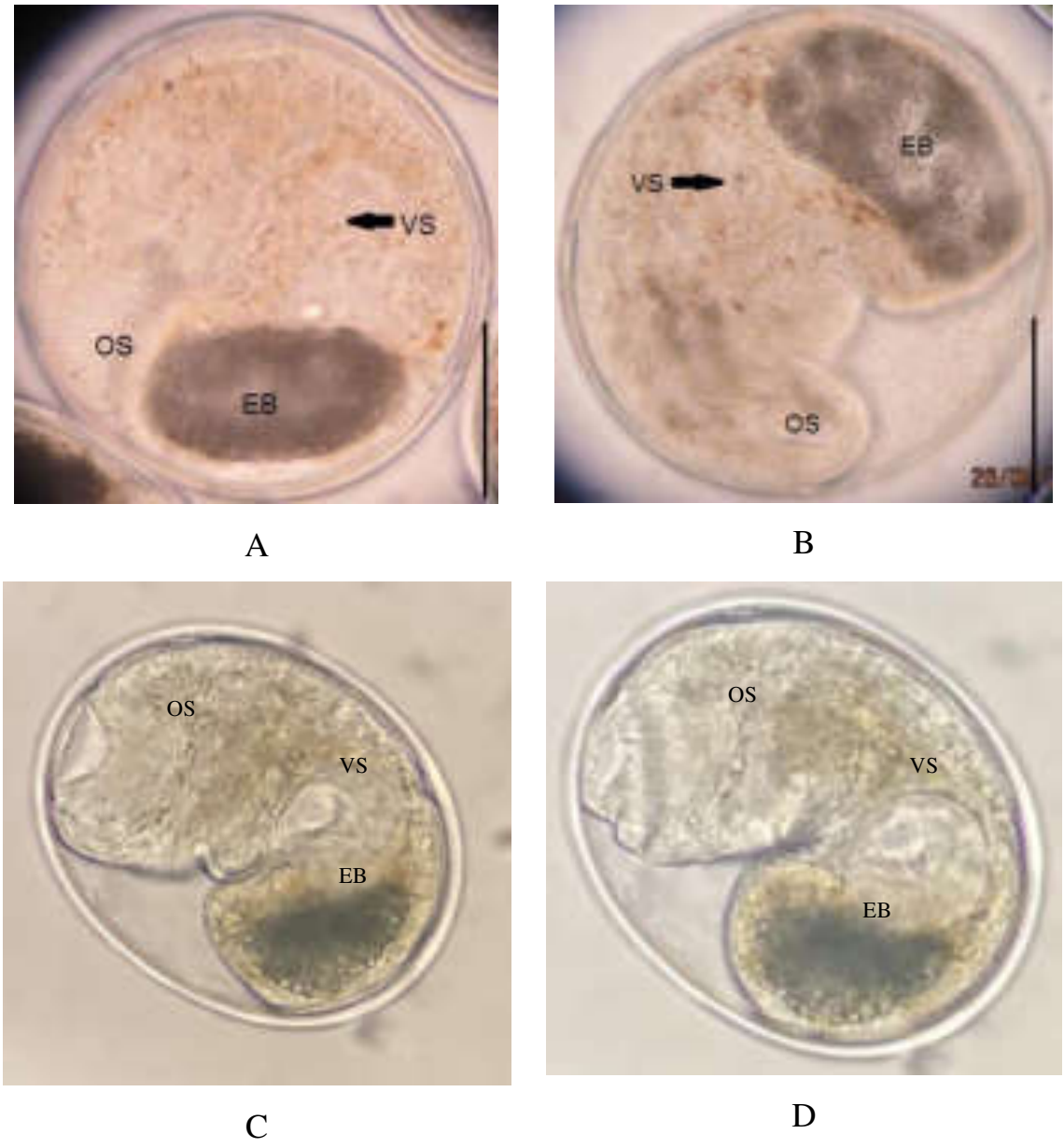
Nhận xét: Chuỗi gen cox1 của mẫu 115 trùng hợp > 99,0% với một số chuỗi của sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.



Hình 3. 12: Cây phả hệ trứng sán lá nhỏ ở người dựa vào CoxI

Nhận xét: Tất cả các mẫu trứng sán ở người trong NC này (3752788ST102, 3752789ST115, 3752790ST241) đều là sán lá gan nhỏ *C. sinensis*.

3.2.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá



A B

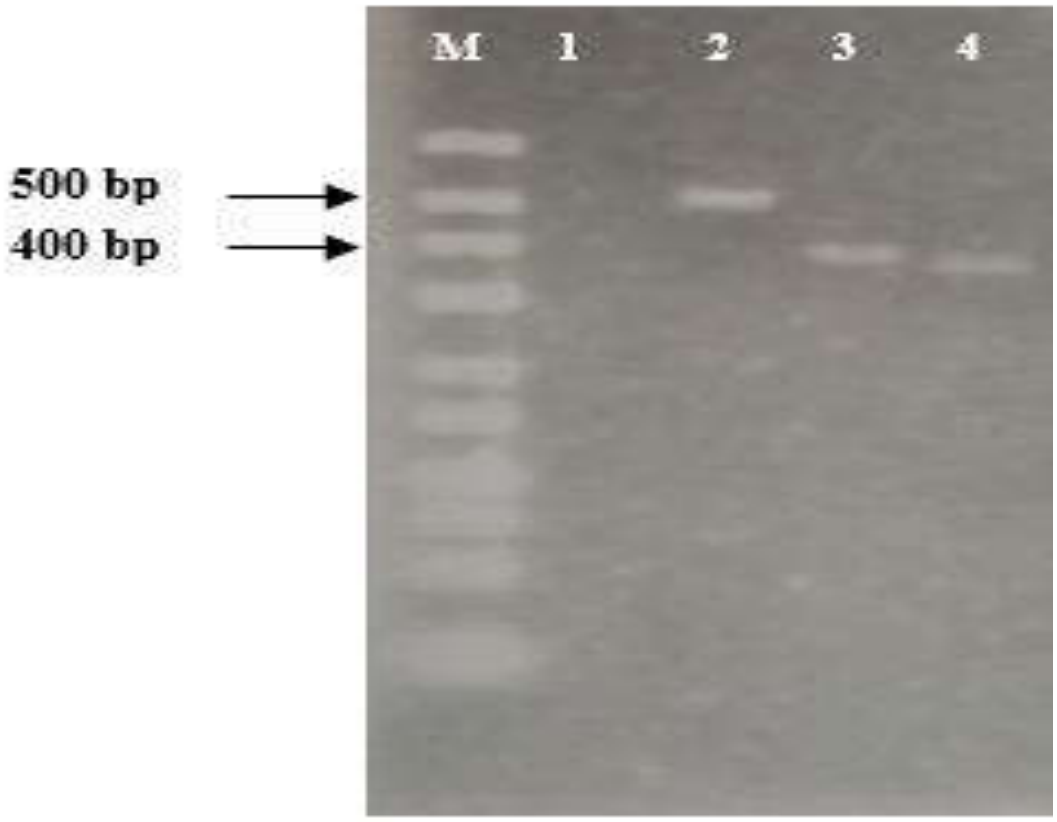
C D

Hình 3. 13: Nang ấu trùng sán lá ruột nhỏ ở cá

A *H. pumilio*; B *H. taichui; C-D C. sinensis*

(chiều dài thước = 75 µm; EB: excretory bladder (tuyến bài tiết), OS: oral sucker (giác miệng); VS: ventrogenital sac (túi sinh dục) với nhiều gai nhỏ (mũi tên).

Nhận xét: Nang ấu trùng *H. pumilio* (A), và ấu trùng nang của *H. taichui* (B) có những gai nhỏ hình chữ I xếp bên trong giác bụng. Nang ấu trùng của C. sinenis (C-D) giác bụng không có gai bám.



Hình 3. 14: Hình ảnh sản phẩm PCR trong nang ấu trùng sán

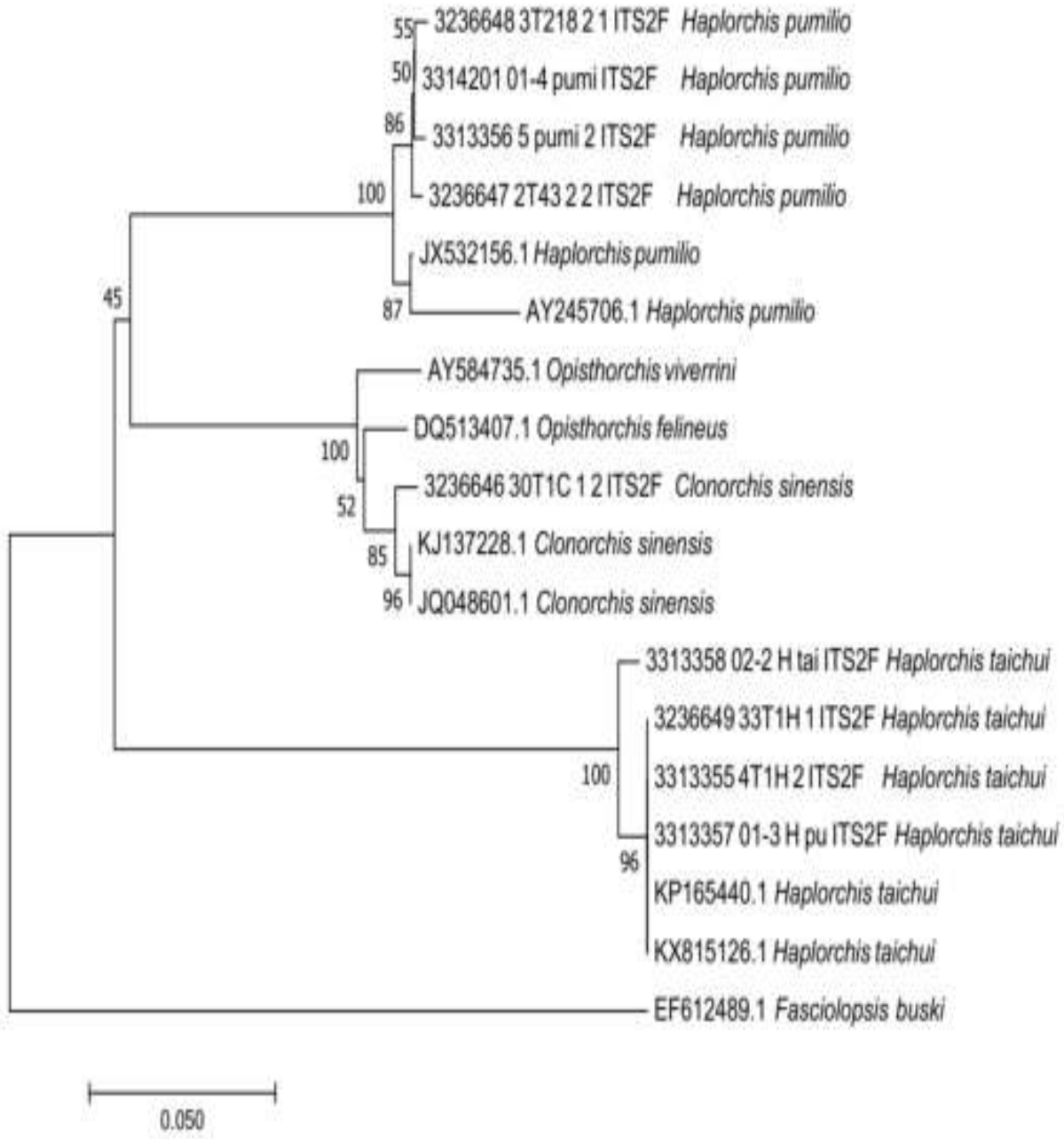
M. Marker 50 bp, 1. Đối chứng âm, 2. *H. taichui*, 3. *H. pumilio*, *4. C. Senisis.*

Nhận xét: Sau khi tách chiết DNA, các mẫu được PCR bằng cặp mồi ITS2 với các kích thước mong đợi lần lượt là 530 bp (*H. taichui*), 380 bp (*H. pumilio*), 390 bp (*C. sinensis*).

Bảng 3. 42: Một số chuỗi gen ấu trùng sán đã đăng ký trên ngân hàng gen

Mã trên ngân hàng gen	Loài	Mã mẫu
MK453254	*Haplorchis pumilio*	2T43
MK453255	*Haplorchis pumilio*	218
MK780187	*Clonorchis sinensis*	30T1C
MK790157	*Haplorchis taichui*	33T1

Nhận xét: Kết quả trên cá phát hiện được 3 loại nang ấu trùng SLGN: *C. Sinensis* và SLRN: *H. pumilio, H. taichui* .



Hình 3. 15: Cây phả hệ nang ấu trùng SLGN, SLRN dựa vào ITS2

Nhận xét: Một số chuỗi gen từ nang ấu trùng trong nghiên cứu này cùng với một số chuỗi khác trên ngân hàng gen (JX532156, AY245706, AY584735, DQ513407, KJ137228, JQ048601, KP165440, KX815126, EF612489) được sử dụng để xây dựng cây phả hệ, bằng phần mềm MEGA 7 theo phương pháp Neighbor joining. Kết quả phát hiện được nang ấu trùng của SLGN: *C. Sinensis* và SLRN: *H. pumilio, H. taichui* .

Bảng 3. 43: Thành phần, số lượng nang ấu trùng phát hiện được trên 1 cá

Nang sán	Nhiều nhất	Ít nhất	Tổng	Trung bình	Độ lệch chuẩn	Tỷ lệ (%)
H. pumilio	2.426	0	18.294	53,03	270,67	99,84
H. taichui	7	0	26	0,08	0,73	0,14
C. sinensis	2	0	3	0,01	0,15	0,02
Tổng	2.430	0	18.323	53,11	174,21	100

Nhận xét: Thu thập được 18.323 nang ấu trùng của 3 loài sán, trong đó nang ấu trùng của *H. pumilio* chiếm 99,84%.

Bảng 3. 44: Tỷ lệ nhiễm từng loại nang ấu trùng trên cá nước ngọt

Cá	Số XN	Nhiễm *H. pumilio (a)*		Nhiễm *H. taichui (b)*		Nhiễm *C. sinensis*(c)		Giá trị p
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
Mè (1)	87	58	66,7	2	2,3	0		(a-b) < 0,05 (a-b;c) < 0,05 (b-c) > 0,05
Trôi (2)	53	8	15,1	0	0	0		
Trắm (3)	51	40	78,4	5	9,8	2	3,9	
Chép (4)	52	45	86,5	0	0	0		
Rô phi (5)	52	1	1,9	0	0	0		
Giá trị p		(1-2;4;5) <0,05 (2;3;4) < 0,05		(1-3) > 0,05		-		

Nhận xét: Nang ấu trùng của *H. pumilio* xuất hiện trên tất cả các loài cá; trên cá trắm xuất hiện nang ấu trùng của cả ba loài sán.

Bảng 3. 45: Cường độ nhiễm nang ấu trùng từng loại sán trong cá (nang ấu trùng/gam cá)

Loài	n	Tối đa	Trung bình
H. pumilio	345	48,52	1,0591 ± 0,2705
H. taichui	345	0,14	0,0015 ± 0,0006
C. sinensis	345	0,04	0,0002 ± 0,0001

Nhận xét: Mật độ nang ấu trùng sán lá nhỏ là 1,24 nang ấu trùng/gam cá; cao nhất ở cá trắm (6,4 nang ấu trùng/gam). Mật độ cao nhất là *H. pumilio* (1,06 ấu trùng/gam cá).

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016.

4.1.1. Đặc điểm dịch tễ học nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

4.1.1.1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

Luận án đã tiến hành điều tra 400 đối tượng sinh sống lâu dài tại 2 huyện Kim Sơn, Yên Khánh, tỉnh Ninh Bình.

Kết quả của các nghiên cứu trước đây cho thấy tuổi nhiễm sán thường là người trưởng thành, đã có ăn gỏi cá cho nên luận án chọn chủ đích đối tượng từ 15 tuổi trở lên. Về khía cạnh xã hội học thì các em dưới 15 tuổi là lứa tuổi còn thụ động, trên 15 tuổi là tuổi bắt đầu tham gia các hoạt động cộng đồng và chủ động ăn gỏi cá [134]. Đặng Thị Cẩm Thạch và cs (2008) nghiên cứu trên 1155 trường hợp từ 6 tuổi trở lên tại Kim Sơn, Ninh Bình thấy không có đối tượng nào dưới 20 tuổi có ăn gỏi cá [15].

Tuổi trung bình của đối tượng nghiên cứu là 46,8 ± 11,57 tuổi. Tỷ lệ giới nam 61,0%; nữ là 39,0%. Do hai huyện chủ yếu làm nông nghiệp nên các đối tượng nghiên cứu chủ yếu làm ruộng, trình độ học vấn có hạn; hầu hết đều chỉ học phổ thông, rất ít đối tượng có trình độ học vấn cao hơn (trung học, đại học).

Tỷ lệ đối tượng trả lời nhà có sử dụng hố xí hợp vệ sinh cao (87,25%). Kết quả này cho thấy có nhiều tiến bộ trong sử dụng nhà tiêu so với kết quả chương trình mục tiêu quốc gia về nước sạch và vệ sinh môi trường nông thôn năm 2004 (có 45% hộ gia đình có nhà tiêu hợp vệ sinh) [88]. Sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến nhiều bệnh lý đường tiêu hóa. Nguyễn Võ Hinh và cộng sự (2005) cho rằng sử dụng nhà tiêu chưa bảo đảm liên quan tới tình trạng nhiễm giun cao tại huyện A Lưới, Thừa Thiên – Huế [135].

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu điển hình cho một vùng đồng bằng Bắc bộ với phần lớn người dân sống gần sông, nhà có ao nuôi cá. Kết quả của luận án phù hợp với nghiên cứu của Trần Đáng và cộng sự (2006) tại Tân Thành, Kim Sơn thấy hệ thống sông ngòi và ao hồ nhiều, trung bình mỗi gia đình có 1 ao thả cá

[136]. Phần lớn người dân nuôi các loại động vật có thể đóng vai trò vật dự trữ mầm bệnh SLGN, SLRN như chó, mèo; các loại động vật này được thả rông, không có chỗ vệ sinh riêng biệt. Theo Santarem VA và cộng sự (2011) người dân ở khu vực nhiệt đới thường có thói quen thả rông chó, mèo do đó chó mèo nhiễm giun đũa Toxocara spp. có thể gây ô nhiễm một vùng rộng lớn, dễ lây nhiễm sang người [137]. Mặt khác phương thức chăn nuôi động vật cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng nhiễm mầm bệnh ở động vật với động vật thả tự do có tỷ lệ nhiễm cao hơn [76].

4.1.1.2. Đặc điểm về kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

- Kiến thức về sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

Có 72,5% đối tượng đã có thông tin (nghe/ nói) về SLGN. Tỷ lệ này khác biệt theo nhóm tuổi có ý nghĩa, khác biệt theo giới chưa có ý nghĩa thống kê. Nhiều người đã mắc bệnh và được điều trị bệnh sán tại các cơ sở y tế; ngoài ra có nhiều chương trình can thiệp về truyền thông cũng như điều trị hàng loạt được triển khai tại địa phương nên người dân đã có ít nhiều thông tin về sán lá gan nhỏ. Tỷ lệ nghe nói về sán lá gan nhỏ khác biệt theo nhóm tuổi có ý nghĩa thống kê; lứa tuổi trẻ (từ 29 tuổi trở xuống) ít biết về sán lá gan nhỏ. Kết quả này cũng phù hợp với một nghiên cứu khác tại Trung Quốc cho thấy nam giới trưởng thành có hiểu biết tốt hơn về đường lây, tác hại của sán lá gan nhỏ so với nữ giới, trẻ em [81]. Theo luận án cần phải truyền thông giáo dục sức khỏe nhiều hơn cho các đối tượng trẻ tuổi về nguy cơ nhiễm sán và mắc bệnh nguy hiểm để họ biết và chủ động phòng bệnh.

Mặc dù có tỷ lệ cao người dân trả lời đã từng nghe nói về SLGN, SLRN nhưng tỷ lệ hiểu biết đúng vẫn còn ở mức vừa phải. Có 68,8% đối tượng trả lời nhiễm của SLGN, SLRN qua ăn gỏi cá, 58,3% trả lời qua ăn rau sống, 18,8% cho rằng qua da, 2,8% trả lời không biết. Tỷ lệ biết nhiễm SLGN, SLRN qua ăn gỏi cá cao hơn so với một báo cáo năm 2006 kết quả điều tra tại một số tỉnh miền Trung, tỷ lệ người dân tại Phú Yên, Quảng Ngãi, Quảng Nam, Bình Định biết ăn cá diếc

sống có thể nhiễm SLGN từ 2 – 23%; tỷ lệ không biết nguyên nhân nhiễm sán từ 55 – 90% [81]. Tuy nhiên vẫn còn một số người trả lời không biết hoặc lây nhiễm qua da, qua ăn rau sống. Một tỷ lệ lớn (58,3%) người cho rằng ăn rau sống có thể nhiễm sán. Một số tác giả nhắc đến khả năng lây nhiễm sán lây truyền qua cá ở người không ăn gỏi cá do lây nhiễm nang ấu trùng trong quá trình chế biến [15]. Ăn rau sống cũng có thể liên quan đến nhiễm SLGN, SLRN khi người dân ăn gỏi cá thường có nhiều người, dùng cùng đôi đũa gắp gỏi cá và rau sống do đó có thể rau sống cũng nhiễm nang ấu trùng sán tuy nhiên đây không phải là con đường chính [86].

Có 69,3% đối tượng biết ăn chín có thể phòng đượcSLGN , tỷ lệ này có xu hướng tăng theo tuổi và ở nữ giới tuy nhiên khác biệt chưa có ý nghĩa. Đa số người dân biết ăn gỏi cá có thể nhiễm sán và ăn cá chín có thể phòng nhiễm sán. Kết quả này có thể cho thấy hiện nay khả năng tiếp cận thông tin của người dân tốt hơn. Tuy nhiên vẫn cần phải tích cực, tuyên truyền để nâng cao hiểu biết của người dân địa phương.

Có 68,5% đối tượng trả lời nhiễm của SLGN gặp nhiều ở cả hai giới; chỉ 28,0% biết chủ yếu gặp ở nam giới. Phần lớn các thống kê đều cho thấy SLGN chủ yếu gặp ở nam giới, điều này liên quan tới tỷ lệ ăn gỏi cá, yếu tố nguy cơ chính; thường cao hơn ở nam giới so với nữ giới. Nguyễn Văn Đề và cộng sự (2003) nghiên cứu trên 6.000 đối tượng thấy tỷ lệ nhiễm ở nam là 32%; nữ là14,6% ($p < 0,0001$) [44].

Phần lớn người dân còn chưa hiểu rõ các tác hại của SLGN, SLRN. Tác hại của sán lá nhỏ được biết nhiều nhất là đau bụng (53%), đau vùng gan (41,5%), nhiều hơn so với các tác hại khác có ý nghĩa. Kết quả điều tra ở miền Trung cũng thấy tỷ lệ người dân không biết tác hại của SLGN rất cao (75 – 90%) [81]. Một số đối tượng biết sán có thể gây đau bụng, đau vùng gan tuy nhiên những ảnh hưởng rất nặng nề của sán như ung thư hay sỏi đường mật, viêm đường mật rất ít người nhắc tới. Nhìn chung người nhiễm SLGN thường ít triệu chứng. Các triệu chứng thường chỉ xuất hiện ở người nhiễm trung bình hoặc nặng với sốt, mệt mỏi,

ban dị ứng, các triệu chứng rối loạn tiêu hóa, đau bụng hay đau hạ sườn phải, các triệu chứng tắc mật, viêm đường mật tái diễn, sỏi đường mật, áp xe gan và áp xe đường mật, xơ gan, viêm tụy, viêm gan, ung thư gan đường mật (cholangiocarcinoma) [138]. Cần phải tăng cường thông tin để người dân có hiểu biết tốt hơn về tác hại của sán từ đó tăng cường ý thức vệ sinh phòng bệnh.

Điều tra về biện pháp phòng chống cho thấy 62,0% biết không dùng phân tươi nuôi cá có thể phòng được bệnh; chưa có sự khác biệt giữa các nhóm tuổi và giới. Do trong vòng đời sán trứng sán cần phải vào nước và vào được vật chủ một là các loại ốc nên các biện pháp quản lý phân, không dùng phân tươi nuôi cá có ý nghĩa trong phòng chống bệnh. Kết quả điều tra tại miền Trung thấy tỷ lệ người dân biết quản lý phân có thể phòng nhiễm SLGN thấp, 0% ở Phú Yên, Quảng Ngãi, 14% ở Quảng Nam và 45% ở Bình Định [81].

Kết quả nghiên cứu cho thấy người dân có kiến thức nhất định vềSLGN, tuy nhiên biết chính xác về đường lây, tác hại hay biện pháp phòng chống sán lá gan nhỏ còn nhiều hạn chế và cần tuyên truyền thêm, nâng cao kiến thức của người dân. Rất nhiều tác giả khuyến cáo sự cần thiết của nâng cao nhận thức của người dân trong phòng chống bệnh SLGN. Nghiên cứu tại Trung Quốc thấy kiến thức phòng chống có liên quan đến tình trạng nhiễm SLGN (OR = 0,16, P <0,01) [82]. Nghiên cứu của Kaewpitoon SJ và cộng sự (2016) tại Thái Lan cho thấy kiến thức, thái độ và thực hành (KAP) trước và sau khi tham gia giáo dục sức khỏe có sự khác biệt rõ rệt [139]. Các đối tượng cần ưu tiên trong truyền thông là những người lớn tuổi, đã ăn gỏi cá và có nguy cơ nhiễm sán. Một đối tượng ưu tiên khác là lứa tuổi học sinh, chưa ăn gỏi cá; giáo dục sức khỏe đối tượng này rất có ý nghĩa trong kiểm soát dài hạn [140].

- Thái độ khi biết nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ:

Đa số đối tượng (96,8%) chọn lựa phương án đi khám bác sĩ nếu biết nhiễm sán. 74,3% sẽ không ăn gỏi cá nếu biết bị nhiễm bệnh nguy hiểm. Theo kết quả điều tra của luận án đa số đối tượng trả lời sẽ không ăn nữa nếu biết ăn gỏi cá sẽ nhiễm bệnh nguy hiểm, một số ít trả lời giảm số lần ăn, chỉ có 3,3% vẫn ăn. Đây

là một tín hiệu đáng mừng để tuyên truyền, mặc dù các nghiên cứu trên thế giới đều cho rằng rất khó khăn để thay đổi hành vi ăn gỏi cá, một món ăn truyền thống của người dân [29]. Điều tra tại Nam Định cho thấy người dân tại đây vẫn có ý định ăn gỏi cá mặc dù biết ăn gỏi cá có thể nhiễm bệnh [86].

- Thực hành ăn gỏi cá của người dân

Kết quả điều tra cho thấy tỷ lệ ăn gỏi cá khá cao (73,3% đối tượng ăn gỏi cá), tỷ lệ ăn gỏi cá giữa hai huyện khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với một số nghiên cứu tại các vùng dịch tễ lưu hành sán lá nhỏ ở người tại Việt Nam thấy tỷ lệ ăn gỏi cá ở những vùng này rất cao. Một số nghiên cứu thấy tỷ lệ ăn gỏi cá tại Kim Sơn 67,9%, tại Nam Định 77,8% [127]. Điều tra của Trần Văn Quyên (2012) tỷ lệ người dân ăn gỏi cá ở Nghĩa Hưng (Nam Định) 64,8% cao hơn rất nhiều so với Thanh Trì (14,35%), Gia Lâm (13,2%) (Hà Nội) và Thanh Hà (11,67%) (Hải Dương), đây là yếu tố góp phần duy trì sán lá nhỏ lưu hành ở Nam Định [76]. Có lẽ tỷ lệ ăn gỏi cá vẫn cao đã góp phần duy trì tình trạng nhiễm sán lá lây truyền qua cá tại địa điểm nghiên cứu.

Tỷ lệ ăn gỏi cá ở các nhóm tuổi khác biệt chưa có ý nghĩa. Tỷ lệ nam giới ăn gỏi cá (85,7%) cao hơn nữ giới (53,8%) có ý nghĩa thống kê. Kết quả cũng cho thấy hành vi ăn gỏi cá khác biệt theo nhóm tuổi và giới. Ăn gỏi cá là hoạt động mang tính cộng đồng cao, phụ thuộc khu vực, tuổi, giới. Hà Duy Ngọ, Tạ Huy Thịnh điều tra tại huyện Nghĩa Hưng tỉnh Nam Định, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình thấy tỷ lệ ăn gỏi cá ở người lớn (35,7%) cao hơn so với trẻ em (dưới 15 tuổi 5,3%); tỷ lệ nam giới ăn gỏi (88,1%) cao hơn nhiều so với tỷ lệ nữ giới ăn gỏi cá (11,9%).

Lý do thông thường để ăn gỏi cá là thích là ăn (27,5%), uống rượu (26,8%). Lý do ăn gỏi cá rất đa dạng, thông thường nhất chỉ đơn giản là thích ăn. Đôi khi vì lý do xã hội (tiếp khách hoặc được mời ăn). Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu trước đây tại Nghĩa Hưng và Kim Sơn, lý do ăn gỏi cá chủ yếu do gia đình tự làm (57,5%), ngoài ra còn được mời ăn (42,5%). Nghiên cứu tại miền Trung cũng thấy lý do thích là ăn phổ biến nhất (42,85 – 77,8%), người khác lôi

kéo (2,4 – 42,9%) [81]. Điều này ảnh hưởng tới việc tuyên truyền, vận động người dân không ăn gỏi cá rất nhiều, một số trường hợp họ muốn hạn chế ăn gỏi tuy nhiên vì lý do xã hội họ lại tiếp tục ăn gỏi cá.

Địa điểm ăn gỏi cá thường là ở nhà (58,25%), phù hợp với kết quả nghiên cứu của Hà Duy Ngọ, Tạ Huy Thịnh. Ăn cá ở nhà hàng được coi là có nguy cơ bị nhiễm SLGN cao hơn [86]. Mặc dù vậy thì cá dùng cho ăn gỏi của người dân địa phương chủ yếu có nguồn gốc tại chỗ do đó tình trạng nhiễm nang ấu trùng sán trong các loại cá thường được ăn gỏi tại địa phương có ảnh hưởng lớn đến tình trạng nhiễm sán ở người.

Đa số người dân ăn cá từ ao nuôi (68,0); ao tự nhiên (48,0%); tỷ lệ ăn cá từ biển, đầm hay cá sông thấp. Nghiên cứu tại Kim Sơn năm 2006 thấy nguồn cá để làm gỏi chủ yếu là từ ao của gia đình (60,6%), đánh bắt từ nguồn tự nhiên (ruộng, mương, sông) 15,2% và 24,2% là mua ở chợ [141]. Nghiên cứu tại Thanh Hóa cũng thấy đa số người dân ăn gỏi cá từ ao nhà (62,6%) [69]. Một số nghiên cứu trên cá tại Việt Nam thấy cá từ ao nuôi có tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán thấp hơn so với cá đánh bắt tự nhiên từ đó ảnh hưởng tới nguy cơ nhiễm sán ở người ăn gỏi cá. Nghiên cứu của Nguyễn Mạnh Hùng và cộng sự (2015) trên cá thu được ở Gia Viễn, Ninh Bình thấy tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng ở cá thu từ ao nuôi là 26,2%, thấp hơn rất nhiều so với cá đánh bắt tự nhiên (69,8%) [11]. Một nghiên cứu tại Gia Viễn, Ninh Bình cho thấy chưa có sự khác biệt giữa tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn cá sống đánh bắt từ ao của họ hay mua ở chợ nhưng tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn cá sống đánh bắt ở sông cao hơn rất nhiều so với người ăn cá sống đánh bắt từ ao nuôi ($P<0,05$) [142].

Các loài cá thường được sử dụng ăn gỏi cá là cá mòi (62,25%), cá mè (52,75%). Loài cá sử dụng để ăn gỏi có sự khác biệt theo từng vùng, miền. Kết quả cho thấy người dân hai huyện Yên Khánh, Kim Sơn hay sử dụng cá mè, cá mòi để ăn gỏi. Ở miền Trung, cá sử dụng ăn gỏi chủ yếu là cá diếc [141]. Một nghiên cứu ở miền Bắc trước đây cũng cho thấy cá thường được sử dụng ăn gỏi là cá mè [63]. Nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy loài cá được sử dụng chủ

yếu trong ăn gỏi là cá mè (51,3%), các loại cá khác (chép, trắm, trôi, rô phi) được sử dụng với tỷ lệ thấp (1,2 – 13,4%), có tới 28,6% ăn nhiều loại cá [69]. Chủng loại cá ảnh hưởng tới khả năng nhiễm sán khi tỷ lệ nhiễm ở cá nhỏ thường cao tuy nhiên ít được sử dụng ăn gỏi, tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng ở những loài cá lớn hơn (cá mè, cá chép) thường thấp hơn nhưng lại hay được sử dụng ăn gỏi hơn [143].

Điều tra tần suất và cách ăn gỏi cá cho thấy 65,6% người dân ăn gỏi cá ăn 1 lần/tháng. Số ăn nhiều (hàng ngày hay hàng tuần) thấp, phù hợp với kết quả nghiên cứu tại Kim Sơn năm 2006 thấy tỷ lệ hộ ăn thường xuyên là 0,43%; hộ thỉnh thoảng ăn là 36,3% và hộ ít khi ăn gỏi cá là 63,3% [141]. 98,4% người ăn gỏi cắt nhỏ cá thành mảnh để ăn. Cắt nhỏ cá không ảnh hưởng đến khả năng lây nhiễm sán vì nang ấu trùng sán thường hình cầu và kích thước nhỏ (đường kính 100-200 μm); hàng ngàn nang ấu trùng có thể tìm thấy trong một con cá [144].

- Một số hành vi khác có thể liên quan tới nhiễm sán

Tỷ lệ ăn rau sống cao (79,5%), vẫn còn tình trạng uống nước lã (38%). Mặc dù không còn tình trạng làm nhà tiêu trực tiếp trên ao nhưng vẫn còn 10% người vệ sinh trực tiếp xuống ao; hành vi được coi là một trong những yếu tố nguy cơ chính của nhiễm sán truyền qua cá, một thực tế rất phổ biến ở châu Á [144]. Tỷ lệ người dân tại Yên Khánh, Kim Sơn có thói quen uống nước lã (38%) thấp hơn trong nghiên cứu tại Tuyên Quang và Hà Giang của Trương Đình Bắc (71,1%) [145]. Có 61,75% đối tượng trả lời nhà có sử dụng thớt riêng trong chế biến thức ăn sống và chín. Điều này cũng được coi là một trong các yếu tố góp phần làm giảm tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* [146].

4.1.1.3. Kết quả nghiên cứu tỷ lệ, cường độ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

- Kết quả nghiên cứu tỉ lệ nhiễm *SLGN, SLRN*

Trong nghiên cứu này luận án sử dụng kỹ thuật formalin – ether là kỹ thuật được sử dụng nhiều và được coi là có độ nhạy cao trong xét nghiệm ký sinh trùng trong phân nói chung và sán lá nhỏ nói riêng. Trong các nghiên cứu kỹ thuật Kato-Katz và formalin-ether thường được sử dụng để sàng lọc hàng loạt trong vùng lưu

hành sán, được coi là có độ nhạy và độ tin cậy tương đương [147]. Kỹ thuật tập trung formalin-ether được coi là có khả năng phát hiện trứng sán cao hơn so với các kỹ thuật khác. Số lượng trung bình của mẫu phân xét nghiệm là 1-2 g, nhiều hơn 1.000-2.000 lần so với kỹ thuật trực tiếp, nhiều hơn rất nhiều của 40 – 50 mg phân trong xét nghiệm Kato Katz do đó nhạy hơn rất nhiều [19].

Kết quả tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ tại Kim Sơn, Yên Khánh là 19,5%; vẫn duy trì ở mức so với các nghiên cứu trước đây tại Ninh Bình. Tại huyện Kim Sơn, điều tra về sán lá gan nhỏ cho thấy tỷ lệ nhiễm tại xã Kim Bình năm1991 là 27,4%, xã Kim Chính năm 1992 là 29,6%; xã Đồng Hướng năm 1994 là 18,5%; năm 1995 là 22,5%; tại xã Tân Thành năm 1998 là 30,29%; tại xã Ân Hòa và xã Kim Định năm 1998 là 31,15%, xã Yên Lộc năm 1999 – 2000 là 23,5%. Giai đoạn 1991 – 1996 tỷ lệ nhiễm chung cả huyện là 25,8% tăng lên 34,3% trong những năm 1995 – 2000. Sau năm 2000 tỷ lệ nhiễm có xu hướng giảm đi. Năm 2002 tỷ lệ nhiễm tại huyện Kim Sơn là 13%; năm 2004 là 22,5% [141], [148]. Tỷ lệ 19,5% thấp hơn so với một thông báo năm 2000 tại Kim Sơn (26,1%) [149] nhưng cao hơn kết quả nghiên cứu tại huyện Gia Viễn – một huyện lân cận năm 2015 (16,47%) [142]. So với một số nghiên cứu khác ở miền Bắc mới được thông báo thì tỷ lệ này khá cao. Ngọ Văn Thanh (2016) nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy tỷ lệ nhiễm là 14,5% [69]. Nguyễn Thị Thanh Huyền (2018) nghiên cứu tại Hiệp Hòa, Bắc Giang thấy tỷ lệ nhiễm là 12,8% [150]. Với tỷ lệ nhiễm SLGN, SLRN 19,5% chứng tỏ Ninh Bình vẫn là tỉnh nhiễm SLGN, SLRN cao.

Kết quả này cho thấy mặc dù đã tiến hành nhiều biện pháp phòng chống khác nhau tại cộng đồng nhưng tỷ lệ nhiễm SLGN, SLRN trên người tại hai huyện Kim Sơn, Yên Khánh; tỉnh Ninh Bình vẫn chưa giảm nhiều, do đó cần tiến hành các nghiên cứu tiếp theo để đề xuất được các biện pháp có hiệu quả làm giảm sự lưu hành sán lá nhỏ tại địa phương.

- Kết quả nghiên cứu cường độ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

Cường độ nhiễm sán trung bình là 517,06 (trứng/gam phân). 87,17% đối tượng nhiễm nhẹ, không có đối tượng nào nhiễm mức độ nặng. Kết quả nghiên

cứu của luận án phù hợp với các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam đều thấy cường độ nhiễm SLN trong cộng đồng thường rất thấp. Theo WHO tỷ lệ nhiễm trong cộng đồng phần lớn là nhiễm nhẹ (88,9%); tỷ lệ nhiễm nặng chỉ khoảng 1%. Ở Việt Nam nghiên cứu của Kino và cộng sự (1998) tại Đồng Hướng, Kim Sơn thấy cường độ nhiễm trung bình là 504 EPG. Đỗ Trung Dũng và cộng sự (2007) nghiên cứu tại Nghĩa Hưng, Nam Định thấy 86,2% nhiễm nhẹ, 13,8% nhiễm trung bình, không có trường hợp nào nhiễm nặng [109]. Cũng tại Nam Định nghiên cứu năm 2011 thấy cường độ nhiễm trung bình 336 EPG [127]. Nhìn chung số lượng sán trưởng thành liên quan với số lượng trứng sán trong phân [151] và biểu hiện lâm sàng [152]. Do phần lớn các trường hợp nhiễm nhẹ do đó ít triệu chứng, tại các bệnh viện ít phát hiện được người nhiễm SLGN [153].

4.1.1.4. Một số yếu tố liên quan nhiễm sán sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ

- Liên quan giữa tuổi và nhiễm sán

Tỷ lệ nhiễm sán có xu hướng tăng theo nhóm tuổi, cao nhất ở nhóm tuổi 50 – 59. Sự khác biệt tỷ lệ nhiễm sán giữa các nhóm tuổi chưa có ý nghĩa thống kê. Cường độ nhiễm sán trung bình có xu hướng tăng theo tuổi nhưng sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê. Kết quả cho thấy tỷ lệ và cường độ nhiễm chưa thấy liên quan đến tuổi mặc dù nhóm người cao tuổi (từ 50 tuổi trở lên) có cường độ nhiễm sán trung bình lớn nhất tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

Nói chung, nhiễm SLGN, SLRN thường gặp ở người lớn, với tỷ lệ mắc tăng theo tuổi. Các đặc điểm phân bố giữa các độ tuổi chủ yếu liên quan đến tập quán xã hội do đáp ứng miễn dịch thường ít có vai trò quan trọng trong nhiễm SLGN. Ở một số vùng, cường độ nhiễm tăng theo tuổi nhưng giảm sau tuổi 50-60 [36]. Tỷ lệ mắc cao nhất ở Nhật Bản trong những người từ 30-50 tuổi; trong khi ở một số khu vực Trung Quốc, trẻ em dưới 15 tuổi cũng phát hiện nhiễm [154]. Nghiên cứu ở Hàn Quốc thấy tỷ lệ nhiễm ở trẻ em thấp hơn người lớn [155]. Điều này phản ánh hành vi, người lớn thường ăn cá sống và uống rượu nhiều hơn trẻ em. Nghiên cứu tại Hàn Quốc thấy tỷ lệ nhiễm *C. sinensis*cao nhất là ở những người trong độ tuổi 40 [78]. Nghiên cứu tại Trung Quốc không tìm thấy đối tượng <17

tuổi hay > 81 tuổi bị nhiễm *C. sinensis* [156]. Một nghiên cứu khác thấy tỷ lệ tăng theo độ tuổi và đạt cao nhất ở nhóm tuổi 50-59 hoặc 40-49, cường độ nhiễm cũng đạt đến đỉnh cao trong các nhóm tuổi 50-59 [157]. Mặc dù đa số các nghiên cứu cho thấy tuổi là một yếu tố ảnh hưởng tỷ lệ nhiễm nhưng một nghiên cứu tại Trung Quốc thấy sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm không đáng kể giữa các nhóm tuổi [82].

Các nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy trong khu vực vùng đồng bằng sông Hồng, người lớn thường có tỷ lệ nhiễm cao hơn trẻ em. Nghiên cứu tại Nam Định thấy tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ khác nhau đáng kể giữa giữa các nhóm tuổi; ở nam giới tỷ lệ cao hơn đáng kể ở những người> 40 tuổi (χ^2 7.95, p <0,05). Ngược lại, ở nữ không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm tuổi (χ^2 0.85, p> 0,05); cường độ nhiễm khác biệt đáng kể giữa những người <40 tuổi và những người> 40 tuổi (χ^2 4.17, p <0,05) [109]. Nghiên cứu của Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa (2011) thấy tỷ lệ nhiễm sán lá lây truyền qua cá tăng lên theo độ tuổi, đạt mức cao nhất trong độ tuổi 40-59 năm (28,2-28,7%) [127].

- Liên quan giữa giới và nhiễm sán

Tỷ lệ nhiễm ở nam (26,6%) cao hơn ở nữ (8,3%) có ý nghĩa thống kê (p< 0,001; OR = 3,994). Cường độ nhiễm trung bình ở nam cao hơn ở nữ có ý nghĩa thống kê (p< 0,05). Trên thế giới cũng như ở Việt Nam có nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt tỷ lệ nhiễm giữa hai giới tuy nhiên những nghiên cứu có sự khác biệt thì đều thống nhất là tỷ lệ và cường độ nhiễm ở nam cao hơn nữ.

Tại Trung Quốc thấy nam giới nhiễm cao hơn nữ giới 1,64 lần [87], 1,29 lần [156] tuy nhiên cũng có nghiên cứu thấy khác biệt không đáng kể [82]. Tại Hàn Quốc một số nghiên cứu thấy nam nhiễm cao hơn nữ [108], [78] tuy nhiên cũng có nghiên cứu chưa thấy sự khác biệt [158] hoặc sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm sán phụ thuộc tuổi (cao hơn ở nam giới 41-50 tuổi) [155].

Tại Việt Nam đa số các kết quả đều ghi nhận tỷ lệ nhiễm ở nam giới cao hơn so với nữ giới. Kino và cộng sự thấy tại Đồng Hướng, Kim Sơn tỷ lệ nữ nhiễm rất thấp (1,5%) so với nam giới là 23,4%. Nguyễn Văn Đề và cộng sự (2003) thấy tỷ lệ nhiễm ở nam (32%) cao hơn so với nữ (14,6%) (p <0,0001) [44]. Nghiên

cứu của Đỗ Thái Hòa (2006) tại Thanh Hóa thấy nam giới có nguy cơ nhiễm sán lá gan nhỏ cao gấp 2,63 lần so với nữ [83]. Nghiên cứu của Đỗ Trung Dũng (2007) tại Nam Định cũng thấy tỷ lệ nhiễm khác nhau đáng kể giữa nam giới (68,7%) và nữ (23,1%) [109]. Nghiên cứu của Đặng Thị Cẩm Thạch (2008) thấy tỷ lệ nhiễm ở nam cao hơn 3,6 lần so với ở nữ [15]. Nghiên cứu của luận án cho thấy tỷ lệ nhiễm có sự khác biệt và cường độ nhiễm ở nam cũng cao hơn ở nữ, mặc dù vậy thì đa số đối tượng đều có cường độ nhiễm thấp nên sự khác biệt về cường độ nhiễm chưa có ý nghĩa nhiều về lâm sàng và dịch tễ học.

Trong nghiên cứu này do đa số người dân đều có trình độ học vấn vừa phải (hầu hết chỉ học phổ thông) do đó luận án không tiến hành phân tích mối liên quan giữa trình độ học vấn với nhiễm sán.

- Liên quan giữa nghề nghiệp và nhiễm sán

Kết quả nghiên cứu của luận án chưa thấy sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm sán giữa nông dân và nghề khác. Có một số nghiên cứu tại Việt Nam thấy nông dân có nguy cơ nhiễm sán truyền qua cá cao hơn (OR = 4,05) so với nhóm nghề khác [142]. Một nghiên cứu tại Thái Lan cũng thấy tỷ lệ nhiễm sán *O. viverrini* ở nông dân so với nghề khác [159]. Có thể trong nghiên cứu của luận án người dân địa phương, bao gồm nông dân và người làm nghề khác đều ăn gỏi cá nên tỷ lệ nhiễm sán chưa có sự khác biệt.

- Liên quan giữa trình độ học vấn và nhiễm sán

Phân tích trên hai nhóm trình độ học vấn, từ trung học cơ sở trở xuống và trung học phổ thông trở lên thấy tỷ lệ nhiễm sán khác nhau chưa có ý nghĩa thống kê. Tại Việt Nam có một số nghiên cứu cho thấy sự liên quan giữa trình độ học vấn và nhiễm sán lây truyền qua cá, người có trình độ học vấn cao hơn có tỷ lệ nhiễm thấp hơn, người có trình độ học vấn từ trung học cơ sở có nguy cơ nhiễm thấp hơn so với người có trình độ tiểu học (OR=0,63, 95%=0.38–1.05) và những người học đại học không bị nhiễm [142]. Theo luận án thì kiến thức về sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ quan trọng hơn kiến thức chung. Nghiên cứu tại Trung Quốc thấy kiến thức phòng chống có liên quan đến tình trạng nhiễm SLGN [82]. Nghiên

cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy có mối liên quan giữa kiến thức, thái độ, thực hành sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh với tình trạng nhiễm SLGN [83].

- Liên quan giữa ăn gỏi cá và nhiễm sán:

Tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn gỏi cá (24,9%) cao hơn ở người không ăn gỏi cá (4,7%; OR = 6,769; p < 0,001).

Tất cả các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam đề thống nhất ăn gỏi cá là yếu tố nguy cơ nhiễm SLGN, SLRN. Tại Việt Nam một số nghiên cứu thấy thói quen ăn gỏi cá làm tăng nguy cơ nhiễm *C. sinensis* 53 lần [15], 2,3 lần [86]. Tại Hàn Quốc nghiên cứu thấy thói quen ăn cá nước ngọt sống làm tăng nguy cơ nhiễm *C. sinensis* khoảng 2,5 lần [78], 3,2 lần [108]. Nghiên cứu tại Trung Quốc, Lào cũng thấy ăn cá sống là nguy cơ chính nhiễm sán *C. sinensis* [89], [146] và *Opisthorchis viverrini* [160].

Mặc dù ăn gỏi là nguy cơ nhiễm sán nhưng có một số người không ăn gỏi cá vẫn bị nhiễm sán. Trong luận án có 5 (6,4%) người bị nhiễm trả lời không ăn gỏi cá bao giờ. Một số nghiên cứu khác cũng phát hiện tình trạng tương tự. Nghiên cứu tại Kim Sơn, Ninh Bình năm 1999 – 2000 thấy tỷ lệ nhiễm sán ở người không ăn cá sống là 3,3% [15], tại Gia Viễn, Ninh Bình năm 2015 thấy người không ăn gỏi cá có tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ là 4,57% [142]. Nghiên cứu của Phan Thị Vân (2011) ở Nam Định thấy 25,8% người nhiễm trả lời không ăn cá sống [86]. Lý do được đưa ra là ở Việt Nam món cá sống được tiêu thụ tại các cuộc tụ họp xã hội, các đĩa thức ăn và nước chấm được dùng chung do đó gây nhiễm chéo nang ấu trùng sán [86]. Mặt khác nhiễm sán cũng có thể xảy ra thông qua ô nhiễm đồ dùng, bàn tay và thớt dùng để chế biến cá [161].

Tần suất ăn gỏi cá có ảnh hưởng tới nhiễm sán. Tỷ lệ nhiễm sán ở người ăn gỏi cá ở mức độ vừa phải (1 – 3 lần/tháng) so với người ăn gỏi cá nhiều lần (hàng tuần) thấp hơn có ý nghĩa thống kê. Một nghiên cứu tại Nam Định thấy người ăn gỏi cá 1 – 6 lần /năm có tỷ lệ nhiễm 34,7%; trong khi đó người ăn hơn 6 lần/năm có tỷ lệ nhiễm 43,2% [86]. Người không ăn gỏi cá có thể bị nhiễm sán nhưng cường độ nhiễm thấp hơn rất nhiều so với cường độ nhiễm ở người có ăn gỏi cá.

Cường độ nhiễm ở người không ăn gỏi cá trong luận án này là 140,45 EPG. Nghiên cứu của Đặng Thị Cẩm Thạch và cộng sự (2008) tại Kim Sơn, Ninh Bình thấy người không ăn gỏi cá có cường độ nhiễm 33,64 EPG; thấp hơn rất nhiều so với người ăn gỏi cá (497,17 EPG); tần suất ăn gỏi cũng ảnh hưởng tới cường độ nhiễm, người ăn gỏi cá ít hơn 10 lần/năm có cường độ nhiễm trung bình 560 EPG; người ăn 10 – 20 lần có cường độ nhiễm 1190 EPG; người ăn > 20 lần/năm có cường độ nhiễm 2930 EPG chứng tỏ sự liên quan giữa tần suất ăn và cường độ nhiễm [15].

- Liên quan một số yếu tố khác và nhiễm sán

Các hành vi như ăn rau sống, uống nước lã, vệ sinh xuống ao không liên quan tới nhiễm sán. Hành vi dùng thớt riêng cho thức ăn sống và chín không ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm sán. Mặc dù ăn cá sống là cách nhiễm chủ yếu, nhiễm sán cũng có thể xảy ra thông qua ô nhiễm đồ dùng, bàn tay và thớt dùng để chế biến cá [161]. Tỷ lệ người dân tại Yên Khánh, Kim Sơn có thói quen uống nước lã thấp hơn trong nghiên cứu tại Tuyên Quang và Hà Giang của Trương Đình Bắc (71,1%) [145]. Mặc dù vậy trong nghiên cứu này các hành vi trên không liên quan tới nhiễm sán lá gan nhỏ, có thể do đây là những yếu tố gián tiếp; ảnh hưởng của yếu tố trực tiếp là ăn cá sống mạnh hơn do đó những yếu tố khác không làm thay đổi nguy cơ nhiễm. Một nghiên cứu ở Thâm Quyến thấy các yếu tố bảo vệ chống nhiễm *C. sinensis* là sử dụng thớt riêng biệt cho thực phẩm chín và sống [146]. Tình trạng thiếu vệ sinh trong nhà bếp của nhà hàng dễ dàng dẫn đến thớt và đồ dùng nhiễm nang ấu trùng sán sau đó có thể làm ô nhiễm thực phẩm khác [144].

Chưa thấy nguy cơ tăng nhiễm sán ở nhà không có hố xí hợp vệ sinh, sống gần sông hay có ao, hồ. Sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến nhiều bệnh lý đường ruột. Nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa thấy có mối liên quan giữa kiến thức, thái độ, thực hành sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh với tình trạng nhiễm sán lá gan nhỏ, nhóm có kiến thức, thái độ, thực hành sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh đạt yêu cầu có tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ thấp hơn nhóm không đạt yêu cầu [83]. Theo một số nghiên cứu nhà có ao nuôi

cá cũng được coi là yếu tố nguy cơ nhiễm sán truyền qua cá [89]. Nghiên cứu tại Việt Nam ở các tỉnh đồng bằng sông Hồng thấy tỷ lệ *C. sinensis* ≤ 31% ở vùng đồng bằng ven biển, 5% ở vùng núi và 16,3% ở vùng cao nguyên chứng tỏ sự liên quan giữa nơi sinh sống với nhiễm sán lá gan nhỏ [44]. Có thể do tỷ lệ nhà có ao nuôi cá cao, do đó ảnh hưởng của gần sông, hồ tới mọi người là như nhau. Một nghiên cứu tại Tân Thành, Kim Sơn thấy trung bình mỗi gia đình có 1 ao thả cá [136]. Tỷ lệ nhiễm FBT cao hơn ở những người sống ở vùng thấp, [44]; gần nguồn nước [162] hay ao cá [89] đã được ghi nhận. Tuy nhiên những mối liện hệ này yếu và Tesana S et al. (1991) đã thông báo tỷ lệ nhiễm sán lá nhỏ cao hơn ở người sống ở xa sông so với người sống gần sông.

Chưa thấy mối liên quan giữa nhà có hố xí hợp vệ sinh (hố xí tự hoại, 2 ngăn) với nhiễm sán, có thể do tỷ lệ có nhà vệ sinh rất cao (95,3%), chủ yếu là hố xí tự hoại, do tỷ lệ sống trong nhà có hố xí không hợp vệ sinh thấp, thống kê chưa đủ tác động. Một nghiên cứu tại Nga An, Nga Sơn, Thanh Hóa thấy nhóm có kiến thức, thái độ, thực hành sử dụng nhà tiêu hợp vệ sinh đạt yêu cầu có tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ thấp hơn nhóm không đạt yêu cầu [69].

Kết quả nghiên cứu thấy nhà có nuôi chó, mèo hay chó, mèo không có chỗ vệ sinh riêng không làm tăng nguy cơ nhiễm sán. Vật dự trữ mầm bệnh của sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ gồm người, chó, mèo, lợn, chuột và nhiều loại động vật ăn cá khá [79], [163]. Tỷ lệ nhiễm *C. sinensis* cao ở mèo (70%), chó (50%) và lợn (27%) tương ứng với tỷ lệ nhiễm cao ở người (31,6%) ở Nam Trung Quốc. Phương thức chăn nuôi chó, mèo ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ nhiễm sán ở chó, mèo. Nghiên cứu của Trần Văn Quyên thấy tỷ lệ nhiễm sán ở chó mèo thường xuyên nhốt là 5,26%; trong khi đó ở chó mèo thường xuyên thả là 13,62% [76]. Phòng chống sán ở động vật có thể làm giảm tỷ lệ nhiễm ở người [91], [91]. Một nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam thấy tỷ lệ nhiễm sán lây truyền qua cá ở mèo (50%), chó (30,8%) khá cao, và sau khi can thiệp bảo vệ ao nuôi cá, tỷ lệ nhiễm ở chó, mèo giảm cùng với giảm tỷ lệ nhiễm ở người [75]. Tỷ lệ nuôi chó mèo cao, chó mèo vệ sinh tự do là chủ yếu làm lây nhiễm cho nhiều loại nguồn nước khác nhau,

những hộ gia đình không nuôi chó mèo cũng bị ảnh hưởng tương tự do đó tỷ lệ nhiễm sán giữa hai nhóm nuôi chó, mèo hoặc không nuôi chó mèo khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê cũng là phù hợp. Mặt khác FBT không lây nhiễm trực tiếp từ động vật sang người do đó không có mối liên quan giữa nuôi chó mèo với nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trong nghiên cứu này cũng phù hợp. Do tình trạng nhiễm sán ở động vật nên biện pháp quản lý phân, tránh ô nhiễm phân vào nguồn nước rất khó thực hiện.

Trong nghiên cứu này luận án không đánh giá được sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm sán với một số yếu tố như chủng loại cá hay cách ăn gỏi cá. Người địa phương ăn gỏi cá nhiều loại cá khác nhau, không phân biệt ở nhà hàng hay ăn ở nhà, khi ăn cũng ít quan tâm tới nguồn gốc cá sử dụng ăn gỏi nên rất khó phân tích tác động của các yếu tố này.

4.1.2. Đặc điểm dịch tễ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá

- Trong nghiên cứu này luận án dựa vào thành phần loài cá được người dân địa phương sử dụng ăn gỏi để xác định các loài cá cần thu thập. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu mục tiêu 1 chúng tôi xác định 6 loài cá, trong đó có 5 loài cá nước ngọt (cá chép, mè, trôi, trắm, rô phi) và một loài cá nước lợ (cá mòi). Tình nhiễm nang ấu trùng trên các loài cá này sẽ ảnh hưởng lớn tới nguy cơ nhiễm sán trên người dân sống tại địa điểm nghiên cứu.

- Tình hình nhiễm nang ấu trùng sán trên cá có thể ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố như chủng loại cá, mùa, đặc điểm nguồn nước nơi cá sinh sống [30]. Luận án tập trung nghiên cứu sự khác biệt về nhiễm nang ấu trùng sán trên các loài cá khác nhau, chủ động lựa chọn thu cá trong khoảng thời gian từ tháng 5 đến tháng 8. Theo một số nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam đây là thời điểm cá có tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán cao nhất [71].

- Luận án xét nghiệm 345 cá thuộc 6 loài khác nhau, trọng lượng trung bình 147,58 gam. Trong vùng dịch tễ SLGN, các loài cá nhỏ thường có tỷ lệ nhiễm cao hơn tuy nhiên chúng hiếm khi được sử dụng ăn sống do đó ít ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm ở người. Các loài cá lớn (cá chép *C. carpio*, cá mè *H. molitrix*...) thường có

tỷ lệ và cường độ nhiễm thấp hơn nhưng người thường ăn nhiều lần, sán trưởng thành *C. sinensis* tích lũy trong ống mật thời gian dài do đó dẫn đến sự tích tụ của sán trong gan và nhiễm nặng [89]. Nghiên cứu ở cá hoang dã trong hồ Thác Bà, tỉnh Yên Bái thấy mật độ và tỷ lệ nhiễm của *C. sinensis* trong loài nhiễm cao nhất, *T. houdemeri*, thay đổi theo kích thước cá; tỷ lệ cao hơn ở cá có trọng lượng hơn 3 g, và cường độ cao hơn ở cá có trọng lượng hơn 5 g [164].

- Tỷ lệ cá thu được tại địa điểm nghiên cứu nhiễm nang ấu trùng là 44,1%. Tỷ lệ này tương đương với kết quả nghiên cứu của Phan Thị Vân và cộng sự trên cá thu được ở Ninh Bình (45,7%) [74], của Trần Thị Kim Chi và cộng sự trên cá ở Nghệ An (44.6%) [72]. Đáng chú ý là cá ở Ninh Bình được coi là có tỷ lệ nhiễm cao hơn cá thu được ở Nam Định Phan, Ersbøll, Nguyen, et al., 2010). Nghiên cứu tại Nga Sơn, Thanh Hóa của Ngọ Văn Thanh tỷ lệ cá nhiễm nang ấu trùng chỉ 11,6% [69]. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hợp và cộng sự (2008) thấy tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán trên cá thu được ở Hà Nội là 5%; cá ở Nam Định là 4,6% [71].

- Cá chép, trắm và cá mè có tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng sán cao nhất, cá mòi không nhiễm nang ấu trùng sán. Các loài cá có tỷ lệ nhiễm cao là cá chép (86,5%), trắm (78,4%) và cá mè (66,7%), chỉ có cá mòi không nhiễm nang ấu trùng sán. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu khác. Madsen và cộng sự (2017) nghiên cứu tại Gia Viễn, Ninh Bình thấy tỷ lệ nhiễm ở cá trắm là 78,8%; cá mè 83,6%; [131]. Phan Thị Vân và cộng sự (2010) xét nghiệm cá ở Nam Định thấy hầu hết các loài cá nước ngọt đều nhiễm nang ấu trùng sán, một số loài cá có tỷ lệ nhiễm cao là cá chép (82%), cá mè (86%), cá trắm (87%)... [32]. Một nghiên cứu khác trên cá ở miền Bắc Việt Nam cũng thấy các loài cá như cá chép (75%), cá mè (40%), trắm (62,8%) [72]. Tuy nhiên so với 2 nghiên cứu này thì tỷ lệ nhiễm trên cá trôi của luận án thấp hơn (15,1% so với 74% và 56,3%). Cá rô phi có tỷ lệ nhiễm thấp (1,92%), tương đương với một nghiên cứu ở Thái Lan [165].

- Mật độ nang ấu trùng sán lá nhỏ là tương đối thấp (1,24 nang ấu trùng/gam cá). Trên thế giới có những thông báo mật độ nhiễm nang ấu trùng sán FBT trên cá rất cao. Nghiên cứu tại Trung Quốc trên cá *Pseudorasbora parva,* một loài cá

kích thước tương đối nhỏ, có mật độ trên 6.000 nang ấu trùng/gam cá. Mật độ nang ấu trùng cao nhất ở cá trắm (6,4 nang ấu trùng/gam), các loài cá khác có mật độ nhiễm thấp (<0,5 nang ấu trùng/gam cá). Một số nghiên cứu khác cũng thấy mật độ nang ấu trùng trên cá trắm cao nhất (1,9 nang ấu trùng/gam), sau đó là cá mè (0,8) trong số các loại cá nghiên cứu (trung bình là 0,7) [32]. Nghiên cứu của Trần Thị Kim Chi và cs (2008) thấy cường độ nhiễm nang ấu trùng trên cá trắm ở ao ương là 7,1; cá chép là 0,4; mè 0,2 nang ấu trùng/gam cá [72]. Nghiên cứu của Madsen và cộng sự (2015) tại Nam Định thấy mật độ nang ấu trùng trong cá trắm cỏ là cao nhất (9,23 nang ấu trùng/gam cá), sau đó là cá mè (4,75 nang ấu trùng/g cá), cá rô phi chỉ có 0,59 nang ấu trùng/gam cá [131].

- Nghiên cứu cũng tìm hiểu tình hình nhiễm nang ấu trùng sán lây truyền qua cá trên cá mòi (cá mòi cờ chấm - *Konosirus punctatus*) là loại cá ở biển, di cư vào trong sông để đẻ trứng; đẻ xong cá lại trở ra biển. Tại Hàn Quốc đã phát hiện cá *K. punctatus* nhiễm nang ấu trùng sán *Heterophyopsis continua* với tỷ lệ 58,3% [166]. Ở Việt Nam cũng đã phát hiện được nang ấu trùng sán *H. continua* trên cá biển (*Epinephelus coioides*, *Epinephelus bleekeri*, *Mugil cephalus*) ở Khánh Hòa [167]. Tại Nam Định cũng đã phát hiện được nang ấu trùng của sán này trên cá *Coilia lindmani* [58], [73]. Con trưởng thành đã được phát hiện ở mòng biển (*Larus genei* [167]. Những kết quả này cho thấy cá mòi cờ chấm cũng có khả năng nhiễm nang ấu trùng sán lá ruột nhỏ *H. continua*, loài sán này cũng có khả năng gây bệnh ở người và đã phát hiện được trên động vật ở Việt Nam. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy cá mòi *K. punctatus* không nhiễm nang ấu trùng sán. Tại Việt Nam cũng chưa phát hiện được trường hợp nào nhiễm *H. continua* ở người. Kết quả này cho thấy trong khi mục tiêu người dân từ bỏ hoàn toàn thói quen ăn gỏi cá rất khó [85]. thì có thể tuyên truyền lựa chọn các loại cá có tỷ lệ nhiễm thấp hoặc không nhiễm nang ấu trùng sán như cá mòi.

4.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ bằng hình thái và kỹ thuật sinh học phân tử.

4.2.1. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người

4.2.1.1. Nghiên cứu xác định thành phần loài dựa vào đặc điểm hình thái

- Kết quả nghiên cứu trứng sán

Kết quả nghiên cứu thấy trứng sán lá nhỏ trong phân hình bầu dục, hơi nhỏ hơn ở một đầu, có vai rõ ràng bao quanh nắp ở một đầu và một núm nhỏ (gai, knob) hình dấu phẩy ở đầu bên kia, bề mặt vỏ trứng nhìn không rõ thô ráp hay trơn nhẵn. Với hình ảnh này có thể là trứng sán lá gan nhỏ (*C. sinensis*, *O. viverrini*) hay sán lá ruột nhỏ (*H. taichui, H. pumilio*...).

Kích thước trứng sán lá nhỏ thu được trong phân dài trung bình 28,6 µm, rộng trung bình 16,3 µm, tỷ lệ chiều dài trên chiều rộng là 1,76. Với kích thước này phù hợp với trứng sán lá gan nhỏ *C. sinensis*, tuy nhiên cũng không phân biệt được với trứng sán lá ruột nhỏ. Do dựa vào đặc điểm hình thái rất khó xác định trứng của sán nào luận án quyết định xác định loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử.

- Kết quả nghiên cứu hình thái sán trưởng thành:

Luận án thu được nhiều sán trưởng thành tuy nhiên chỉ chọn các cá thể tương đối nguyên vẹn, có thể nhuộm quan sát hình thể để nghiên cứu các đặc điểm hình thái. Tất cả các sán thu được đều có thân dẹt, hình lá, thon dài, phía trước nhỏ hơn phía sau. Có hai giác bám là giác miệng (OS) và giác bụng (VS). Với kích thước trên 1 cm chiều dài thì chúng thuộc nhóm sán lá gan nhỏ vì các loài sán lá ruột nhỏ con trưởng thành có lê, kích thước nhỏ, 400 × 150 µm ngoại trừ *H. popelkae* khoảng 1.117,4 × 200 µm [100].

Tại Việt Nam một số nghiên cứu đã xác định có sự lưu hành của hai loài sán lá gan nhỏ là *C. sinensis* và *O. viverrini.* Phân biệt hai loài này dựa chủ yếu vào kích thước (sán *C. sinensis* có kích thước lớn hơn *O. viverrini*) và đặc điểm tinh hoàn (sán *C. sinensis* có tinh hoàn chia nhánh trong khi đó sán *O. viverrini* có tinh hoàn phân thùy). Theo một số tác giả sán *C. sinensis* trưởng thành kích thước 11 - 20 mm x 3- 4,5 mm, phẳng, thon nhọn về phía trước và tròn phía sau; khi

sống gần như trong suốt. Kích thước có thể thay đổi tùy thuộc vào cường độ nhiễm trùng và đường kính của các ống mật nơi sán ký sinh. Bề mặt không có gai, giác bụng nhỏ hơn giác miệng, hai tinh hoàn chia nhánh nằm ở cuối thân [18]. Sán *O. viverrini* trưởng thành có hình hạt bí, dẹt, thon về phía trước và chiều dài khoảng 2,0-4,5 mm. Bề mặt cơ thể nhẵn, không có gai, có nhiều rãnh hẹp, không đều. Giác miệng ở đầu sán; giác bụng hình bầu dục hoặc gần tròn, nằm giữa phần thứ nhất và thứ hai của cơ thể. Cả hai giác được bao quanh bởi nhiều nhú. Lỗ sinh dục, nằm sát với rìa trước của giác bụng, có nhiều cấu trúc giống như ngón tay. Dựa trên đặc điểm hình thái, kích thước thì nhiều khả năng là sán lá *C. sinensis*. Một yếu tố quan trọng nữa là về vùng phân bố thì đa số các nghiên cứu ở Việt Nam đều chỉ phát hiện được *C. sinensis* ở miền Bắc Việt Nam, còn *O. viverrini* ở miền Trung. Do đó nhiều khả năng sán thu được là sán *C. sinensis.* Tuy nhiên để có cơ sở khoa học hơn luận án tiến hành định danh cả trứng sán và sán trưởng thành bằng sinh học phân tử.

4.2.1.2. Kết quả định danh sán bằng sinh học phân tử

- Kết quả định danh trứng sán bằng sinh học phân tử

Do dựa vào đặc điểm hình thái trứng sán rất khó định danh loài sán nên luận án đã tiến hành áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử để định danh trứng sán. Có rất nhiều kỹ thuật có thể định danh được trứng sán trong phân tuy nhiên luận án lựa chọn kỹ thuật PCR và giải trình tự sản phẩm PCR với hai chỉ thị là ITS2 và Cox-1, hai chỉ thị ở hai hệ gen khác nhau, đảm bảo độ chính xác của kết quả định danh.

Các xét nghiệm dựa trên phương pháp PCR nhằm phát hiện DNA sán trong phân là phương pháp tiếp cận đầy tiềm năng với độ nhạy ở cấp độ phòng thí nghiệm đạt mức $2x10^{-17}$ ng DNA trong mẫu phân [111]. Có nhiều nghiên cứu định danh sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ, dựa vào cả trên hệ gen nhân và hệ gen ty thể. Bộ gen ty thể chứa 12 gen mã hóa protein (cox1-3, nad1-6, nad4L, atp6 và cytb), 20 (*O. viverrini*) hoặc 22 (*C. sinensis*) gen chuyển RNA, hai gen RNA ribosome và hai vùng không mã hóa (*C. sinensis*) [168]. Các chỉ thị được ứng

dụng nhiều trong định danh sán là cox-1 và nad1. Hệ gen nhân: hay nghiên cứu DNA ribosome (rDNA) đặc biệt vùng ITS được coi là một chỉ thị tin cậy và chính xác trong định danh sán lá. Trong các gen được nghiên cứu thì ITS được coi là nhạy hơn so với các gen hệ gen ty thể. Saiwasan Buathong (2015) nghiên cứu so sánh độ nhạy của (ITS2) –PCRvới phương pháp PCR phát hiện cox1 và nad1 phát hiện *O. viverrini* trong các mẫu phân; độ nhạy của cox1-PCR và nad1-PCR lần lượt là 66,7 và 50%; độ nhạy của cox1-PCR và nad1-PCR đạt 89,1 và 71,7% trong các mẫu chứa trứng *O. viverrini* > 100 EPG [169]. Giữa hai vùng ITS cũng có độ nhạy khác nhau, vùng ITS2 có độ nhạy cao hơn so với ITS1. Sato và cộng sự (2009) nghiên cứu thấy ở các điều kiện PCR tối ưu hóa, độ nhạy của PCR với ITS1 (76,2%) thấp hơn so với ITS2 (95,2%). Thử nghiệm Kappa cho thấy một phù hợp vừa phải (k = 0,75) giữa PCR ITS1- và xét nghiệm phân Kato Katz, PCR vùng ITS1 kém nhạy hơn so với phương pháp Kato Katz. PCR với vùng ITS2 có độ nhạy cao hơn, mức phù hợp (k = 0,95) [112].

Có nhiều kỹ thuật sinh học phân tử khác nhau được ứng dụng trong nghiên cứu sán lá. Kỹ thuật LAMP (phản ứng khuếch đại gen đẳng nhiệt) đã được áp dụng thành công để phát hiện các loại sán lá như *O. viverrini, Clonorchis sinensis, H. pumilio*, *H. taichui*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica* .... với ưu điểm đơn giản, tiến hành nhanh, độ nhạy cao và giá thành hợp lý [170]. Mặc dù xét nghiệm LAMP có ưu điểm không yêu cầu máy điều nhiệt và cho phép phát hiện trực quan khuếch đại DNA bằng độ đục, tuy nhiên phương pháp này làm gia tăng hiện tượng dương tính giả do khả năng khuếch đại cao. Ngoài ra, một số phương pháp phân tử khác cũng được phát triển để định danh sán lá như multiplex PCR, realtime PCR, phân tích PCR DNA đa hình khuếch đại ngẫu nhiên ở nhiệt độ cao (high annealing temperature random amplified polymorphic DNA, HAT-RAPD) ... [117], [43], [121]. Những phương pháp này có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, thời gian phân tích ngắn nhưng đòi hỏi mô hình thiết kế kỹ thuật chính xác, phức tạp cũng như khó tối ưu quy trình định danh nhiều chủng loại. Từ những vấn đề trên, luận án lựa chọn phương pháp PCR dựa trên vùng gen ITS2, sau đó những mẫu

dương tính được giải trình tự, xây dựng cây chủng loại phát sinh để định danh loài. Đây là phương pháp sinh học phân tử cơ bản trong định danh loài với độ nhạy, độ đặc hiệu cao, cho kết quả chính xác khi định danh đồng thời nhiều loại sán mà không cần thiết kế nhiều mồi.

Tỷ lệ mẫu cho sản phẩm PCR là 42,85%. Sinh học phân tử được coi là kỹ thuật có độ nhạy cao mặc dù vậy độ nhạy thấp của kỹ thuật sinh học phân tử trong phát hiện trứng sán trong phân là vấn đề được nhiều tác giả nhắc đến. Kỹ thuật PCR phát hiện DNA trong phân gặp trở ngại là có rất nhiều chất ức chế phản ứng PCR trong phân gồm các chất ức chế không đặc hiệu, urea, hemoglobin, heparin, phenol, SDS, sản phẩm thoái giáng hemoglobin, bilirubin, acid mật, protease vi khuẩn và nuclease trong phân, cũng như mảnh vụn tế bào, axit mật và các yếu tố khác. Một trở ngại khác là trứng sán có vỏ dày, cần phải phá vỡ vỏ trứng để giải phóng ấu trùng trong trứng sán. Nhiều quy trình tách DNA chẩn đoán vi khuẩn và vi rút không áp dụng được để chẩn đoán giun sán do không tính đến thực tế là DNA của ký sinh trùng được bao bọc bởi vỏ trứng [171]. Ngoài ra đ nhạy của sinh học phân tử trong xét nghiệm phân phát hiện trứng sán phụ thuộc rất lớn vào mật độ trứng trong phân. Wongratanacheewin S (2002) thử nghiệm kỹ thuật phát hiện DNA trứng của *O. viverrini* trong phân người so sánh với kỹ thuật Stoll thấy độ nhạy 100% trong các mẫu phân với EPG> 1000, giảm xuống 68,2% trong các mẫu với EPG 200 – 1000 trứng và 50% trong các mẫu phân EPG < 200. Giới hạn phát hiện PCR là 200 trứng có thể được giả định là được sản xuất bởi một con sán trưởng thành, vì một con sán trưởng thành có thể đẻ 50 đến 200 trứng mỗi g phân. Satoskar và cộng sự (2009) nghiên cứu kỹ thuật PCR chẩn đoán phân nhiễm trứng *O. viverrinii,* kỹ thuật có độ nhạy tương quan với mật độ trứng, 100% khi EPG > 1000 giảm xuống 50% khi EPG <200 [93].

Trong nghiên cứu này luận án nghiên cứu vùng ITS (internal transcribed spacer) vì vùng này được coi là có giá trị và tin cậy nhất trong định danh sán [100]. Vùng ITS 2 được lựa chọn vì có độ nhạy cao hơn so với vùng ITS1. Cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu này có thể phát hiện được *O. viverrini, C. sinensis, H.*

pumilio và *H. Taichui;* các loài sán thường được phát hiện trên người ở Việt Nam [172], [69], [109]. Hình ảnh điện di ITS2 cho sản phẩm có kích thước khoảng 400 bp. Kích thước này có thể là sán *H. pumilio* (380 bp) hoặc *C. sinensis* (390 bp) [112].

Kết quả định danh bằng ITS 2 bằng giải trình tự, so sánh với ngân hàng gen và xây dựng cây phả hệ cho thấy tất cả các mẫu trứng sán đều là *C. sinensis*. Để thẩm định lại kết quả này một số mẫu trứng được tiến hành chạy PCR với mồi phát hiện gen cox1, một đoạn gen cũng thường được sử dụng trong định danh sán. Kết quả phân tích cox1 cũng thấy tất cả các mẫu đều là *C. sinensis*. Định danh bằng hai chỉ thị sinh học phân tử của hai hệ gen khác nhau giúp xác định chính xác loài sán, và cũng phù hợp với thực tế là luận án chỉ thu hồi được sán lá gan nhỏ trưởng thành sau khi cho người dân dùng praziquantel và thuốc tẩy.

Kết quả sán *C. sinensis* chiếm ưu thế trong luận án phù hợp với kết quả một số nghiên cứu trước đó tại miền Bắc Việt Nam, xác định thành phần loài sán ở người bằng cách định danh sán trưởng thành thu được sau khi tẩy sán. Đặng Thị Cẩm Thạch và cộng sự (2008) nghiên cứu thấy tất cả sán thu được đều là *C. sinensis* [149]. Một nghiên cứu khác tương tự thì thấy 9/10 người được tẩy sán nhiễm *C. sinensis* và 10/10 người nhiễm sán lá ruột nhỏ [127]. Tuy nhiên kết quả nghiên cứu này khác với kết quả của Đỗ Trung Dũng và cộng sự (2007) cho thấy tỷ lệ nhiễm sán lá ruột nhỏ ở người cao (100%) tuy nhiên nhiễm sán lá gan nhỏ thấp (khoảng 50%) [109].

Kết quả nghiên cứu thành phần loài sán ở người với *C. sinensis* chiếm ưu thế cũng khác biệt với kết quả nghiên cứu trên cá của một số tác giả khác cũng như kết quả nghiên cứu của luận án. Các nghiên cứu trên cá ở miền Bắc Việt Nam đều thấy tỷ lệ cá nhiễm nang ấu trùng *C. sinensis* rất thấp và nhiễm nang ấu trùng sán lá ruột nhỏ rất cao, đặc biệt là (*H. pumilio*) rất cao [11], [72], [131]. Có thể có một số lý do cho sự mâu thuẫn này. Hạn định đời sống của sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở người khác nhau. Sán *C. sinensis* có thể sống tới 26 năm ở người nhưng phần lớn sán lá ruột nhỏ chỉ sống khoảng 1 năm [144] do đó tỷ lệ nhiễm

C. sinensis tích lũy rất cao. Khả năng đẻ trứng của sán cũng khác nhau. Một sán lá gan nhỏ có thể đẻ tới 4000 trứng/ngày [173] trong khi sán lá ruột nhỏ đẻ ít hơn nhiều (sán *H. taichui* chỉ đẻ khoảng 82 trứng/ngày) [174]. Khả năng đẻ trứng ảnh hưởng tới mật độ trứng trong phân và tới độ nhạy của kỹ thuật phát hiện trứng sán bằng sinh học phân tử. Đã có một số thông báo về sự khác biệt giữa kết quả định danh sán lá nhỏ ở người bằng sinh học phân tử và hình thái. Sato và cộng sự (2010) đã sử dụng vùng ITS2 DNA ribosome nghiên cứu tại Lào trên 125 mẫu phân; PCR đã phát hiện các trường hợp nhiễm *O. viverrini* nhưng không phát hiện ra *H. taichui* khi so sánh với thu hồi sán sau dùng thuốc [174].

- Kết quả định danh sán trưởng thành bằng sinh học phân tử

Định danh sán trưởng thành khi phân tích vùng ITS2 cho kết quả các mẫu sán đều là *C. sinensis,* phù hợp với kết quả định danh hình thái. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả định danh trứng sán ở đối tượng nghiên cứu là nhiễm sán lá gan nhỏ *C. sinensis.*

Kết quả này cũng khẳng định lại sự lưu hành của *C. sinensis* trên người tại miền bắc Việt Nam, phù hợp với một số kết quả nghiên cứu trước đây.

4.2.2. Thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá

4.2.2.1. Kỹ thuật xác định thành phần loài nang ấu trùng sán

Trong nghiên cứu này luận án dựa vào thành phần loài cá được người dân địa phương sử dụng ăn gỏi để xác định các loài cá cần thu thập. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu mục tiêu 1 luận án xét nghiệm 6 loài cá, trong đó có 5 loài cá nước ngọt (cá chép, mè, trôi, trắm, rô phi) và một loài cá nước lợ (cá mòi). Tình nhiễm nang ấu trùng trên các loài cá này sẽ ảnh hưởng lớn tới nguy cơ nhiễm sán trên người dân sống tại địa điểm nghiên cứu.

Nhiều tác giả đã nghiên cứu và đưa ra các bảng định danh nang ấu trùng sán ở cá dựa vào các đặc điểm hình thái của nang ấu trùng. Scholz và cộng sự (1991) nghiên cứu các đặc điểm hình thái nang ấu trùng sán lá gan nhỏ (*O. viverrini*) và sán lá ruột nhỏ trên cá thu được ở Lào; Sohn (2009) thu thập và mô tả các đặc điểm hình thái nang ấu trùng sán lây truyền qua cá thu được ở Korea

[175].

Tại Việt Nam dự án FIBOZOA (Fish Borne Zoonotic Parasites) với nỗ lực nhằm tăng cường năng lực cho các Viện/cơ quan để triển khai các nghiên cứu cần thiết góp phần kiểm soát bệnh sán lây truyền qua cá. Dự án được Cơ quan phát triển quốc tế Đan Mạch (Danida) tài trợ đã xuất bản một tài liệu hướng dẫn cách định loại các nang ấu trùng sán lá trên cá hay gặp ở Việt Nam. Các dấu hiệu quan trọng được sử dụng trong định loại là hình dạng nang ấu trùng, kích thước các giác bám, hình dạng và các kiểu tuyến bài tiết, cơ quan sinh sản. Tài liệu này đã giúp việc định danh nang ấu trùng trên cá được dễ dàng hơn và đã được ứng dụng trong một số nghiên cứu ở Việt Nam.

Tại Việt Nam phần lớn các nghiên cứu thành phần loài nang ấu trùng sán ở cá cũng dựa vào đặc điểm hình thái nang ấu trùng

Hình ảnh nang ấu trùng thu được từ cá trong nghiên cứu này giúp luận án định danh được nang ấu trùng của *C. sinensis, H. pumilio, H. taichui*. Để khẳng định kết quả dịnh danh nang ấu trùng sán trên cá bằng hình thái có thể sử dụng kỹ thuật gây nhiễm động vật (mèo, chuột hamstẻ...), sau đó định danh sán trưởng thành thu thập được từ động vật gây nhiễm [110], [73], [58]. Tuy nhiên kỹ thuật này đòi hỏi nuôi, theo dõi động vật, thu hồi sán trưởng thành trong phân, mặt khác nhuộm soi và định danh sán trưởng thành đôi khi rất khó. Hướng thứ hai hiện nay đang được sử dụng nhiều là ứng dụng sinh học phân tử trong định danh nang ấu trùng, sử dụng các chỉ thị ITS2 [97] hay cox 1 [176]. Trong nghiên cứu này luận án lựa chọn kỹ thuật sinh học phân tử để khẳng định kết quả định danh nang ấu trùng sán.

Các nang ấu trùng được định danh cùng loài cho vào cùng 1 ống Eppendorf, sau đó tiến hành tách chiết DNA để định danh bằng sinh học phân tử. Sau khi tách chiết DNA, các mẫu được chạy PCR bằng cặp mồi ITS2 với các kích thước mong đợi lần lượt là 530 bp (*H. taichui*), 380 bp (*H. pumilio*), 390 bp (*C. sinensis*). Các sản phẩm đều lên băng với kích thước đúng như tính toán lý thuyết, đậm nét và không có băng phụ.

4.2.2.2. Kết quả xác định thành phần loài nang ấu trùng sán trên cá

Luận án đã thu thập được 18.323 nang ấu trùng của 3 loài sán, trong đó nang ấu trùng của *H. pumilio* chiếm 99,84%. Kết quả này cũng phù hợp với một số điều tra tại miền Bắc Việt Nam trên cá thu được nang ấu trùng của *H. pumilio* là chủ yếu. Nghiên cứu tại Nam Định năm 2015 trên 1266 con cá, thu được trên 200.000 nang ấu trùng; có 20% không xác định được loài; 77,3% là của *H. pumilio* [131]. Một nghiên cứu khác tại Gia Viễn, Ninh Bình phát hiện 347 nang ấu trùng, trong đó 234 (67,4%) là của *Haplorchis*, còn lại là một số loài sán lá ruột nhỏ khác [11]. Điều tra tại bốn tỉnh Thái Bình, Nam Định, Ninh Bình và Thanh Hóa thấy 94% nang ấu trùng sán thu được là Heterophyidae (*H. pumilio, C. formosanus, H. yokogawi*) [72].

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nang ấu trùng *C. sinensis* trên cá rất thấp, chỉ có 3 nang ấu trùng trên tổng số 18.323 nang ấu trùng thu thập được. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của một số tác giả khác tại Việt Nam thấy nang ấu trùng *C. sinensis* trên cá có tỷ lệ rất thấp. Nguyễn Mạnh Hùng và cộng sự (2015) nghiên cứu tại Gia Viễn, Ninh Bình phát hiện 1/347 nang ấu trùng là của *C. sinensis* [11]. Nghiên cứu tại Nam Định của Madsen và cộng sự (2015) thu được trên 200.000 nang ấu trùng trên cá nhưng không phát hiện được nang ấu trùng của *C. sinensis* [131]. Trần Thị Kim Chi và cộng sự xét nghiệm 716 cá thu được ở bốn tỉnh Thái Bình, Nam Định, Ninh Bình và Thanh Hóa cũng không phát hiện được nang ấu trùng sán *C. sinensis* (*C. formosanus, H. pumilio, H. yokogawi*) [72]. Nghiên cứu trên 717 cá thu được từ Nam Định, Ninh Bình, Bắc Ninh Phan Thị Vân thấy nang ấu trùng *C. sinensis* trên 12 con cá, tỷ lệ 1,5% [74]. Một nghiên cứu trên 15.137 cá ở Thái Bình, Nam Định, Ninh Bình và Thanh Hóa thấy tỷ lệ nang ấu trùng của *C. sinensis* chỉ 0,05% [75].

Nghiên cứu từng loài cá thấy nang ấu trùng sán *H. pumilio* xuất hiện ở tất cả các loài cá. Nhìn chung các nghiên cứu ở Việt Nam đều cho thấy nang ấu trùng sán *H. pumilio* xuất hiện ở nhiều loài cá khác nhau. Nghiên cứu của Trần Thị Kim Chi (2008) phát hiện nang ấu trùng của *H. pumilio* xuất hiện ở tất cả các loài cá

nghiên cứu, loại trừ cá *Anabas testudineus, Leucaspius delineatus, Macropodus opercularis,* tuy nhiên nhóm tác giả chỉ xét nghiệm mỗi loài này một con cá [32], [72].

Trên cá trắm xuất hiện nang ấu trùng của cả ba loài sán; cá chép, cá trôi và cá rô phi chỉ nhiễm nang ấu trùng của một loại sán. Một số nghiên cứu tại miền Bắc Việt Nam cũng cho thấy cá trắm, cá mè có khả năng nhiễm nhiều loại nang ấu trùng sán khác nhau. Nghiên cứu của Phan Thị Vân và cộng sự (2010) thấy cá mè nhiễm 6/6 loại nang ấu trùng, cá trắm nhiễm 5/6 loại nang ấu trùng, cá chép chỉ nhiễm 3/6 loài, cá trôi và cá rô phi chỉ nhiễm 1/6 loài [32]. Trong số nang ấu trùng của 6 loài sán phát hiện được (*Haplorchis pumilo; H. taichui; H. yokogawai, C. formosanus; S. falcatus; Echinochasmu japonicus*) thì cá trắm cỏ nhiễm tới 4 loài (*H. pumilo; H. taichui, C. formosanus và S. falcatus*) [72].

Luận án không phát hiện được nang ấu trùng một số loài sán lá ruột nhỏ khác đã được thông báo trên cá ở Việt Nam như *P. varium, C. formosanus, H. yokogawai S. falcatus* và *E. japonicus*. Sự khác biệt này có thể do khác nhau về chủng loại cá được xét nghiệm hoặc nang ấu trùng của những loại sán này có tỷ lệ thấp. Nguyễn Mạnh Hùng và cộng sự (2015) phát hiện *P. varium, C. formosanus* trên cá (*Labeo rohita*), và một số loài cá khác như *Channa striata*, *Carassius auratus, Rasborinus hautus* thu được ở huyện Gia Viễn, tỉnh Ninh Binh [11] tuy nhiên những loài cá này không được xét nghiệm trong luận án. Nang ấu trùng của *H. yokogawai, S. falcatus* và *E. japonicus* đã được tìm thấy trên cá ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam nhưng với tỷ lệ rất thấp (0,1% với *H. yokogawai*, 0.5% với *S. falcatus* và *E. japonicus*) [72]; [73] do đó không có trong nghiên cứu của luận án cũng phù hợp.

KẾT LUẬN

1. Một số đặc điểm dịch tễ sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại 2 huyện Kim Sơn và Yên Khánh tỉnh Ninh Bình, năm 2016

1.1. Đặc điểm dịch tễ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột trên người:

Qua nghiên cứu 400 người từ 15 tuổi trở lên, sinh sống lâu dài tại địa phương, nghiên cứu có một số kết luận sau:

- Tỷ lệ và cường độ nhiễm

+ Tỷ lệ nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ là 19,5%; Huyện Kim Sơn tỉ lệ nhiễm 20,1%; Huyện yên Khánh 18,9%. Không có sự khác biệt tỷ lệ nhiễm giữa hai huyện. Tỷ lệ nhiễm ở nam giới (26,6%) cao hơn ở nữ (8,3%) ($p< 0,001$).

+ Cường độ nhiễm sán trung bình là 517,06 trứng/g phân; đa số (87,2%) đối tượng nhiễm nhẹ, không có đối tượng nào nhiễm mức độ nặng. Cường độ nhiễm sán trung bình ở nam cao hơn ở nữ.

- Kiến thức, thái độ, thực hành của người dân về phòng chống sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại địa điểm nghiên cứu

+ Tỉ lệ dân đã từng nghe thông tin về sán tương đối cao (72,5%); 68,8% biết sán lây truyền qua ăn gỏi cá, 69,3% biết ăn cá chín có thể phòng bệnh, tỷ lệ biết về tác hại của sán còn thấp. 74,3% đối tượng sẽ không ăn gỏi cá nếu biết ăn sẽ nhiễm bệnh nguy hiểm.

+ 73,3% đối tượng ăn gỏi cá, tỷ lệ nam giới ăn gỏi cao hơn nữ giới. Các loài cá thường được sử dụng để ăn gỏi là cá mòi (62,25%), cá mè (52,75%), cá chép (34,75%), cá trắm (32%). Người dân ăn gỏi cá vì nhiều lý do, ở nhiều địa điểm cũng như cá ở nhiều nguồn khác nhau.

- Yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột trên người

+ Người ăn gỏi cá có nguy cơ nhiễm sán cao gấp 6,8 lần không ăn gỏi cá.

+ Chưa thấy sự liên quan giữa nhóm tuổi, nghề nghiệp, trình độ học vấn, điều kiện sống (sống gần ao hồ, sông; có hố xí hợp vệ sinh, nuôi chó mèo); các hành vi ăn rau sống; uống nước lã, đi chân đất; vệ sinh xuống ao với nhiễm sán.

1.2. Đặc điểm dịch tễ nhiễm nang ấu trùng sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên cá tại hai huyện Kim Sơn và Yên Khánh, Ninh Bình

- Nghiên cứu 345 con cá thuộc 6 loài (cá chép, mè, trắm, trôi, rô phi, mòi), kết quả cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nang ấu trùng chung là 44,1%. Cá chép (86,5%): Cá Trắm (78,4%): Cá mè (66,7%) là 3 loài cá có tỷ lệ nhiễm cao nhất. 5 loài cá nước ngọt đều nhiễm nang ấu trùng. Cá mòi không nhiễm ấu trùng sán.

- Cường độ nhiễm sán trên cá là 1,24 nang ấu trùng/gam cá; Cao nhất ở cá trắm: 6,4 nang ấu trùng/gam, thấp nhất là cá trôi: 0,0004 nang ấu trùng/gam.

2. Thành phần sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại hai huyện Kim Sơn và Yên Khánh, Ninh Bình

2.1. Thành phần (kết luận không được viết tắt) SLGN, SLRN ở người

- Kết quả định danh dựa vào đặc điểm hình thái và sinh học phân tử (42,85% mẫu phân cho sản phẩm PCR, phân tích hai chỉ thị ITS2 và cox1) tất cả trứng sán thu được đều là *Clonorchis sinensis.*

- Kết quả định danh hình thái và sinh học phân tử (phân tích gen vùng ITS2) sán trưởng thành thu được là sán lá gan nhỏ *Clonorchis sinensis*.

2.2. Thành phần SLGN, SLRN ở cá

Thu thập được 18.323 nang ấu trùng của 5 loài cá nước ngọt định danh phát hiện được 3 loài sán, trong đó nang ấu trùng của SLRN *Haplorchis pumilio* chiếm 99,84%, SLRN *Haplorchis taichui* 0,14% và SLGN *Clonorchis sinensis* 0,02%.

Nang ấu trùng của SLRN *Haplorchis pumilio* xuất hiện trên cả 5 loài cá nước ngọt; Riêng cá trắm xuất hiện nang ấu trùng của cả ba loài sán *Haplorchis pumilio*, *Haplorchis taichui, Clonorchis sinensis.*

Cường độ nhiễm cao nhất là của *Haplorchis pumilio* (1,0591 nang ấu trùng/gam cá), thấp nhất là của *Clonorchis sinensis* (0,0002 nang ấu trùng/gam cá).

KIẾN NGHỊ

- Cần tăng cường truyền thông giáo dục sức khỏe về nguy cơ nhiễm bệnh, cách phòng chống sán lá để nâng cao kiến thức người dân, giảm các hành vi liên quan đến sự lây truyền sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trong cộng đồng, đặc biệt là an toàn vệ sinh thực phẩm 'ăn chin, uống chin, không ăn cá chưa nấu chín' góp phần nâng cao sức khỏe cho người dân.

- Tăng cường ứng dụng các kỹ thuật có khả năng định danh chính xác sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở các giai đoạn khác nhau như kỹ thuật sinh học phân tử để có hiểu biết chính xác, khoa học hơn về tình hình dịch tễ của các loại sán ở Việt Nam.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Công bố số liệu vào bản đồ dịch tễ nhiễm sán lá nhỏ của Việt Nam về thực trạng và yếu tố liên quan nhiễm sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ của 2 huyện Kim Sơn, Yên Khánh, tỉnh Ninh Bình, góp phần xây dựng chiến lược phòng chống bệnh sán lá nhỏ tại các khu vực có thói quen ăn gỏi cá của 02 huyện trên có hiệu quả.

2. Xác định thành phần loài sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ trên người áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử từ trứng sán trong phân lần đầu tiên tại Việt nam.

3. Đánh giá được một phần thực trạng nhiễm ấu trùng sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ ở cá tại điểm nghiên cứu. Tập trung vào khảo sát các loài cá hay được sử dụng ăn gỏi như cá chép, cá trắm, cá mè đặc biệt cá mòi (là một loài cá nước lợ cũng được sử dụng ăn gỏi) có ý nghĩa quan trọng trong tuyên truyền hạn chế ăn gỏi cá hay áp dụng các biện pháp an toàn thực phẩm trong phòng chống sán lá gan nhỏ, sán lá ruột nhỏ tại cộng đồng.

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Đoàn Thúy Hòa, Lê Trần Anh, Đỗ Ngọc Ánh, Phạm Văn Minh (2017), "Đặc điểm kiến thức, thái độ, thực hành ăn gỏi cá người dân hai huyện Kim Sơn, Yên Khánh, tỉnh Ninh Bình (Năm 2016)", *Tạp chí Phòng chống bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng,* 1(97), 95-98.
2. Đoàn Thúy Hòa, Lê Trần Anh, Đỗ Ngọc Ánh (2017), "Một số hiểu biết về nhiễm sán lá nhỏ của người dân tại hai huyện Kim Sơn, Yên Khánh, tỉnh Ninh Bình (2016)", *Tạp chí Phòng chống bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng,* 3(99), 75-82.
3. Đoàn Thúy Hòa, Lê Trần Anh, Đỗ Ngọc Ánh, Phạm Văn Minh, Nguyễn Khắc Lực (2018), "Đặc điểm nhiễm nang ấu trùng sán lá nhỏ trên một số loài cá thường được sử dụng ăn gỏi tại huyện Yên Khánh và Kim Sơn, tỉnh Ninh Bình (2016-2017)", *Tạp chí Phòng chống bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng,* 3(105), 57-61.

MỘT SỐ HÌNH ẢNH NHÓM NGHIÊN CỨU THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

NHIỆT LIỆT HƯỞNG ỨNG CHIẾN DỊCH
TÂY SÁN LÁ GAN NHỎ CỘNG ĐỒNG

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. K. Darwin Murrell and Edoardo Pozio (2017). The Liver Flukes: Clonorchis sinensis, Opisthorchis spp, and Metorchis spp. *In: J.B.Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global Water Pathogen Project. http://www.waterpathogens.org (Robertson, L (eds) Part 4 Helminths) http://www.waterpathogens.org/book/liver-flukes Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO*. Springer International Publishing, Cham, 139–180.
2. Fürst T., Keiser J., Utzinger J., et al. (2012). Global burden of human food-borne trematodiasis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, **12**(**3**), 210–221.
3. Toledo R; Alvárez-Izquierdo M; Muñoz-Antoli C; Esteban JG (2019). Intestinal Trematode Infections. *Adv Exp Med Biol*, **1154**, 181–213.
4. Maguire J.H. (2015). Trematodes (Schistosomes and liver, intestinal, and lung flukes). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8th ed.* Philadelphia: Elsevier, Saunders, 3316–26.
5. Toledo R. and Esteban J.G. (2016). An update on human echinostomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **110**(**1**), 37–45.
6. Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., et al. (2013). The zoonotic, fish-borne liver flukes Clonorchis sinensis, Opisthorchis felineus and Opisthorchis viverrini. *Int J Parasitol*, **43**(**12**–**13**), 1013–1046.
7. Trường Đại Học Y Hà Nội - Bộ Môn Ký Sinh Trùng (2012), *Ký sinh trùng y học, Giáo trình đào tạo bác sĩ đa khoa*, Nhà xuất bản y học, Hà Nội.
8. Chai J.-Y.Y. and Jung B.-K.K. (2017). Fishborne zoonotic heterophyid infections: An update. *Food Waterborne Parasitol*, **8**–**9**(**August**), 33–63.
9. Toledo R. and Fried B. (2019), *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 1154*, Springer International Publishing, Cham.

10. Bộ Y tế (2016), *Quyết định số 1931/QĐ-BYT ngày 19 tháng 5 năm 2016 về việc ban hành hướng dẫn tẩy sán lá gan nhỏ tại cộng đồng*, Cục quản lý khám chữa bệnh, chủ biên, Hà Nội, Việt Nam.
11. Hung N.M., Dung D.T., Lan Anh N.T., et al. (2015). Current status of fish-borne zoonotic trematode infections in Gia Vien district, Ninh Binh province, Vietnam. *Parasites and Vectors*, **8**(**1**).
12. Dũng Đ.T. (2014). Xác định đặc điểm hình thái và phân tử một số loài sán lá thuộc họ Heterophyidae và Echinostomatidae ký sinh trên người ở một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam. *Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp viện, năm 2014, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương,* **12**, 11–47.
13. Nguyễn Mạnh Hùng (2016). Kiểm soát dịch bệnh sán lá ở Việt Nam: Hiện trạng, thách thức và hướng giải quyết. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, **6**(**7**), tr. 11-18.
14. Bộ Y tế (2015), *Dịch tễ học ký sinh trùng y học*, Nhà xuất bản Y học Việt Nam, Hà Nội.
15. Dang T., Yajima A., Nguyen V., et al. (2008). Prevalence, intensity and risk factors for clonorchiasis and possible use of questionnaires to detect individuals at risk in northern Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **102**(**12**), 1263–1268.
16. Keiser J. and Utzinger J. (2009). Food-borne trematodiases. *Clin Microbiol Rev*, **22**(**3**), 466–483.
17. Kruithof R. and Erard V. (2017). [Food-borne trematodiases]. *Rev Med Suisse*, **13**(**578**), 1741–1744.
18. Sripa B. (2008). Concerted action is needed to tackle liver fluke infections in Asia. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**(**5**).
19. Murrell K.D. and Fried B. (2008). Food-Borne Parasitic Zoonoses. Fish and Plant - Borne Parasites (World Class Parasites). *Emerg Infect Dis*, **14**(**9**), 53–115.

20. Maclean J.D., Cross J., Mahanty S., et al. (2011). Liver, Lung, and Intestinal Fluke Infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice 3rd Edition*. 3rd, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 849–862.
21. Saijuntha W., Sithithaworn P., Kiatsopit N., et al. (2019). Liver Flukes: Clonorchis and Opisthorchis. *Digenetic Trematodes*. Second Edi, Springer International Publishing, Cham, United States, 139–180.
22. Kaewkes S. (2003). Taxonomy and biology of liver flukes. *Acta Tropica*, Elsevier, 177–186, 177–186.
23. Pozio E., Armignacco O., Ferri F., et al. (2013). Opisthorchis felineus, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. Elsevier.
24. Sripa B., Bethony J.M., Sithithaworn P., et al. (2011). Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. Acta Tropica, 120.
25. World Health Organisation (2019), *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites, second edition.*, World Health Organisation.
26. Chai J.-Y.Y., Murrell K.D., Lymbery A.J., et al. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. Pergamon.
27. Harrington D., Lamberton P.H.L., and McGregor A. (2017). Human liver flukes. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, **2**(**9**), 680–689.
28. Phongsasakulchoti P., Sri-aroon P., and Kerdpuech Y. (2005). Emergence of Opisthorchis viverrini cercariae from naturally infected Bithynia (Digoniostoma) siamensis goniomphalos. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **36 Suppl 4**, 189–191.
29. Tang Z.-L.L., Huang Y., and Yu X.-B.B. (2016). Current status and perspectives of Clonorchis sinensis and clonorchiasis: Epidemiology, pathogenesis, omics, prevention and control. *Infect Dis Poverty*, **5**(**1**), 1–12.

30. Kim C.S., Echaubard P., Suwannatrai A., et al. (2016). Seasonal and Spatial Environmental Influence on Opisthorchis viverrini Intermediate Hosts, Abundance, and Distribution: Insights on Transmission Dynamics and Sustainable Control. *PLoS Negl Trop Dis*, **10**(**11**), e0005121.
31. De-Hua Lai, Xiao-Kun Hong, Bi-Xiu Su, Chi Liang, Geoff Hide, Xiaoli Zhang, Xinbing Yu Z.-R.L. (2016). Current status of Clonorchis sinensis and clonorchiasis in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **110**(**1**), 21–27.
32. Phan V.T., Ersbøll A.K., Nguyen K.V., et al. (2010). Farm-level risk factors for Fish-borne zoonotic trematode infection in integrated Small-scale fish farms in Northern Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*, **4**(**7**), 1–9.
33. Joseph Adrian L Buensalido (2019). Intestinal Flukes. Updated: https://emedicine.medscape.com/article/219662-overview, 1–21.
34. Chai J.Y., Sohn W.M., Jung B.K., et al. (2015). Intestinal helminths recovered from humans in Xieng Khouang Province, Lao PDR with a particular note on Haplorchis pumilio infection. *Korean J Parasitol*, **53**(**4**), 439–445.
35. Andrews R.H., Sithithaworn P., and Petney T.N. (2008). Opisthorchis viverrini: an underestimated parasite in world health. *Trends Parasitol*, **24**(**11**), 497–501.
36. Lier T., Do D.T., Van Johansen M., et al. (2014). High Reinfection Rate after Preventive Chemotherapy for Fishborne Zoonotic Trematodes in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis*, **8**(**6**).
37. Petersen K. (2010). Book Review: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 7th edition. *Clin Infect Dis*, **51**(**5**), 636–637.
38. Kays M.B. (2010). Book Review: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Edition. *Ann Pharmacother*, **44**(**9**), 1510–1511.
39. Sithithaworn P., Andrews R.H., Van De N., et al. (2012). The current

status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 10–16.

40. Elshazly A.M., Soltan D.M., Elsheikha H.M., et al. (2007). Host-induced phenotypic differences in Egyptian Heterophyes heterophyes (Digenea: Heterophyidae). *J Egypt Soc Parasitol*.
41. Aung W.P.P., Htoon T.T., Tin H.H., et al. (2017). First report and molecular identi-cation of Opisthorchis viverrini infection in human communities from Lower Myanmar. *PLoS One*, **12**(**5**), 1–9.
42. Sanpool O., Aung W.P.P., Rodpai R., et al. (2018). Human liver fluke Opisthorchis viverrini (Trematoda, Opisthorchiidae) in Central Myanmar: New records of adults and metacercariae identified by morphology and molecular analysis. *Acta Trop*, **185**, 149–155.
43. Buathong S., Leelayoova S., Mungthin M., et al. (2017). Molecular discrimination of Opisthorchis-like eggs from residents in a rural community of central Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, **11**(**11**), 17.
44. De N. Van, Murrell K.D., Cong L.D., et al. (2003). The food-borne trematode zoonoses of Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **34 Suppl 1**(**1**), 12–34.
45. Lê Bách Quang và cộng sự (2010), *Thực hành Ký sinh trùng (Giáo trình giảng dạy đại học)*, Nhà xuất bản Quân đội nhân dân, Hà Nội.
46. Zhang Y., Zhang Y., Na L., et al. (2014). Prevalence of Clonorchis sinensis infection in freshwater fishes in northeastern China. *Vet Parasitol*, **204**(**3**–**4**), 209–13.
47. De Liberato C., Scaramozzino P., Brozzi A., et al. (2011). Investigation on Opisthorchis felineus occurrence and life cycle in Italy. *Vet Parasitol*, **117**, 67–71.
48. Chhabra M.B., Pathak K.M.L., and Muraleedharan K. (2017). Food-Borne Parasitic Zoonoses: Status, Emerging Risk Factors and Issues: An Overview. *J Foodborne Zoonotic Dis*, **5**(**2**), 16–31.

49. Nguyễn Văn Chương, Bùi Văn Tuấn, Triệu Nguyên Trung và cộng sự (2008). Tình hình nhiễm sán lá gan nhỏ Opisthorchis viverrini sau thời gian can thiệp tại hai tỉnh Phú Yên và Bình Định. *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, **1**, 78–83.
50. Lê Trần Anh và cộng sự (2017). Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh sán lá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống. *Đề tài NCKH cấp tỉnh, Học viện Quân y*.
51. Carey M.A., Covelli V., Brown A., et al. (2018). Influential Parameters for the Analysis of Intracellular Parasite Metabolomics. *mSphere*, **3**(**2**), e00097-18.
52. Chai J.-Y.Y., Park J.-H.H., Han E.-T.T., et al. (2004). Prevalence of Heterophyes nocens and Pygydiopsis summa infections among residents of the western and southern coastal islands of the Republic of Korea. *Am J Trop Med Hyg*, **71**(**5**), 617–622.
53. Chai J.Y., Shin E.H., Lee S.H., et al. (2009). Foodborne intestinal flukes in Southeast Asia. *Korean J Parasitol*, **47**(**SUPPL.**), S69-- S102.
54. Chung O.S., Lee H.J., Kim Y.M., et al. (2011). First report of human infection with Gynaecotyla squatarolae and first Korean record of Haplorchis pumilio in a patient. *Parasitol Int*, **60**(**2**), 227–229.
55. Chai JY and Chai J.Y. (2009). Echinostomes in humans. *The Biology of Echinostomes From the Molecule to the Community*. Springer New York, pp 147--183.
56. Chunge R.N. and Chunge C.N. (2017). Infection with Echinostoma sp. in a group of travellers to Lake Tanganyika, Tanzania, in January 2017. *J Travel Med*, **24**(**5**), 1–3.
57. Cho S.H., Kim T.S.T., Na B.K.B.B.K., et al. (2011). Prevalence of metagonimus metacercariae in sweetfish, plecoglossus altivelis, from eastern and southern coastal areas in korea. *Korean J Parasitol*, **49**(**2**),

161–5.

58. Chai J.-Y.Y., Van De N., Sohn W.-M.M., et al. (2012). Foodborne trematode metacercariae in fish from northern Vietnam and their adults recovered from experimental hamsters. *Korean J Parasitol*, **50**(**4**), 317–325.

59. Chai J.Y. and Lee S.H. (2002). Food-borne intestinal trematode infections in the Republic of Korea. *Parasitol Int*, **51**(**2**), 129–154.

60. Motarjemi Y., Moy G., and Ewen Todd (2014), *Encyclopedia of Food Safety. Volume 1*, Academic Press.

61. Nguyễn Văn Đề và Lê Khắc Thuận (2018), *Sán lá gan*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, Việt Nam.

62. Doanh P.N. and Nawa Y. (2015). Clonorchis sinensis and Opisthorchis spp. in Vietnam: Current status and prospects. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **110**(**1**), 13–20.

63. Nguyễn Văn Đề, Lê Văn Châu, Đặng Thanh Sơn và cộng sự (2004). Tình hình nhiễm và thành phần loài sán lá gan nhỏ tại một số điểm trong vùng lưu hành bệnh ở Nam Định và Ninh Bình. *Thông tin y dược*, **6**, 26–29.

64. Kino H., Inaba H., De N., et al. (1998). Epidemiology of clonorchiasis in Ninh Binh Province, Vietnam. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **29**(**2**), 250–254.

65. Nguyễn Văn Đề, Đặng Thanh Sơn, Lê Văn Châu và cộng sự (2001). Đánh giá thực trạng bệnh sán lá gan Clonorchiasis tại vùng châu thổ sông Hồng. *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, **4**, 96–101.

66. Bùi Ngọc Thanh (2017), *Nghiên cứu hiện trạng ấu trùng sán lá có khả năng lây truyền cho người nhiễm cá ở khu vực miền núi phía Bắc Việt nam*, Viện Hàn Lâm Khoa Học và Công Nghệ Vệt Nam.

67. Đặng Thúy Bình và cộng sự (2014). Xác định ấu trùng sán lá song chủ (Metacercariae) ký sinh trên một số loài cá dựa vào đặc điểm hình thái và di truyền. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, **2**, 15–23.

68. Phan Thị Vân và Bùi Ngọc Thanh (2013). Sán lá lây truyền qua cá tại Việt Nam. *Nhà xuất bản Nông nghiệp*, 87,tr7.
69. Ngọ Văn Thanh (2016), *Thực trạng nhiễm sán lá truyền qua cá trên người, yếu tố liên quan và hiệu quả một số giải pháp can thiệp tại huyện Nga Sơn, Thanh Hóa, năm 2013-2014*, Học viện khoa học và công nghệ.
70. Nguyễn Văn Đề và Nguyễn Thị Hợp (2006). Thông báo sán lá ruột nhỏ thuộc họ Heterophyidae và Echinostomatidae ký sinh trên người Việt nam. *Tạp chí Y học thực hành*, **3**(**536**), 31–33.
71. Hop N.T., De N. Van, Murrell D., et al. (2007). Occurrence and species distribution of fishborne zoonotic trematodes in wastewater-fed aquaculture in northern Vietnam. *Trop Med Int Heal*, **12**(**SUPPL. 2**), 66–72.
72. Chi T.T.K., Dalsgaard A., Turnbull J.F., et al. (2008). Prevalence of zoonotic trematodes in fish from a Vietnamese fish-farming community. *J Parasitol*, **94**(**2**), 423–428.
73. Phan V.T., Ersbøll A.K., Bui T.Q., et al. (2010). Fish-borne zoonotic trematodes in cultured and wild-caught freshwater fish from the Red River Delta, Vietnam. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, **10**(**9**), 861–866.
74. Phan van T., Ersbøll A.K., Nguyen T.T., et al. (2010). Freshwater aquaculture nurseries and infection of fish with zoonotic trematodes, Vietnam. *Emerg Infect Dis*.
75. Clausen J.H., Madsen H., Murrell K.D., et al. (2012). Prevention and control of fish-borne zoonotic trematodes in fish nurseries, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, **18**(**9**), 1438–1445.
76. Trần Văn Quyên, Nguyễn Văn Thọ và Nguyễn Thị Hoàng Yến (2012). Một số đặc điểm dịch tễ bệnh sán lá gan nhỏ do Clonorchis sinensis. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, **10**(**1**), 142–147.
77. Văn Vạn Kim và Nguyễn Văn Thọ (2012). Nghiên cứu dịch tễ ấu trùng sán lá lây truyền qua cá chép giống (Cyprinus carpio) trong các hệ thống

nuôi. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **10**(**6**), 933–939.

78. Kim H.-K.K., Cheun H.-I. Il, Cheun B.-S.S., et al. (2010). Prevalence of Clonorchis sinensis Infections Along the Five Major Rivers in Republic of Korea, 2007. *Osong Public Heal Res Perspect*, **1**(**1**), 43–49.

79. Bruschi F. (2014), *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*, Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London.

80. Hui Y.H., Sattar S.A., Murrell K.D., et al. (2018), *Fish- and Invertebrate-Borne Helminths in Foodborne Disease Handbook - Volume II Viruses, Parasites, Pathogens, and HACCP.pdf*, .

81. Nguyễn Văn Chương, Triệu Nguyên Trung, Nguyễn Văn Khá và cộng sự (2006). Nghiên cứu thực trạng nhiễm sán lá gan nhỏ ở một số tỉnh miền Trung Việt Nam. Bước đầu thử nghiệm một số giải pháp can thiệp, Công trình nghiên cứu khoa học - Báo cáo tại Hội nghị khoa học toàn quốc chuyên ngành sốt rét-ký sinh trùng-côn trùng giai đoạn 2. *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét các bệnh Ký sinh trùng Số chuyên đề*, **2**, 68–80.

82. Yuan Q., Yan X.X.-F.F.X., Gao S.S.-T.T., et al. (2013). Status of Clonorchis sinensis infection and its influencing factors among migrant workers in Baoan District, Shenzhen City. *Chinese J Schistosomiasis Control*, **25**(**1**), 102–105.

83. Đỗ Thái Hòa, Nguyễn Văn Đề, Nguyễn Văn Mạn và cộng sự (2006). Một số yếu tố liên quan đến thực trạng nhiễm sán lá gan nhỏ tại xã Nga An, Nga Sơn, Thanh Hóa. *Y học thực hành*, **536**(**3**), 56–58.

84. Nguyễn Văn Chương và các cộng sự (2006). Nghiên cứu thực trạng nhiễm sán lá gan nhỏ ở một số tỉnh Miền Trung Việt Nam. Bước đầu thử nghiệm một số giải pháp can thiệp. *Công trình NCKH (BC tại Hội nghị khoa học toàn quốc chuyên ngành SR-KST-CT giai đoạn 2001-2005) - Viện SR-KST-CT Trung ương*, 27–44.

85. Roberts L. and Janovy J.J. (2008), *Foundations of Parasitology, 8th*

Edition, McGraw-Hill Science/Engineering/Math.

86. Phan V.T., Ersbøll A.K., Do D.T., et al. (2011). Raw-fish-eating behavior and fishborne zoonotic trematode infection in people of Northern Vietnam. *Foodborne Pathog Dis*.
87. Xue-Ming L., Ying-Dan C., Ouyang Y., et al. (2011). Overview of human clonorchiasis sinensis in China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **42**(**2**), 248–254.
88. Hà Duy Ngọ và Tạ Huy Thịnh (2005). Một số kết quả điều tra về bệnh sán lá gan nhỏ ở sáu xã thuộc hai tỉnh Nam Định và Ninh Bình. *Hội thảo quốc gia về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ nhất*, 789–792.
89. Lo T.C., Chang J.H., Lee H.H., et al. (2013). Risk factors for and prevalence of clonorchiasis in Miaoli County, Taiwan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **44**(**6**), 950–958.
90. Blanton R. (2007). Handbook of Helminthiasis for Public Health. *Emerg Infect Dis*, **13**(**4**), 674–675.
91. Conlan J. V., Sripa B., Attwood S., et al. (2011). A review of parasitic zoonoses in a changing Southeast Asia. *Vet Parasitol*, **182**(**1**), 22–40.
92. Mairiang E., Laha T., Bethony J.M., et al. (2012). Ultrasonography assessment of hepatobiliary abnormalities in 3359 subjects with Opisthorchis viverrini infection in endemic areas of Thailand. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 208–211.
93. Abhay R. Satoskar, Simon G.L., Hotez P.J., et al. (2009), *Medical parasitology*, CRC Press.
94. Toledo R., Esteban J.G., and Fried B. (2006). Immunology and Pathology of Intestinal Trematodes in Their Definitive Hosts. *Adv Parasitol*, **63**(**06**), 285–365.
95. Sripa B., Kaewkes S., Intapan P.M., et al. (2010). Food-borne trematodiases in Southeast Asia epidemiology, pathology, clinical manifestation and control. *Adv Parasitol*, **72**, 305–350.

96. Watthanakulpanich D., Waikagul J., Maipanich W., et al. (2010). Haplorchis taichui as a possible etiologic agent of irritable bowel syndrome-like symptoms. *Korean J Parasitol*, **48**(**3**), 225–229.
97. Van Van K., Dalsgaard A., Blair D., et al. (2009). Haplorchis pumilio and H. taichui in Vietnam discriminated using ITS-2 DNA sequence data from adults and larvae. *Exp Parasitol*, **123**(**2**), 146–151.
98. Kim Văn Vạn và Nguyễn Văn Thọ (2013). Nghiên cứu dịch tễ ấu trùng sán lá truyền lây qua cá chép giống (Cyprinus carpio) theo mùa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **10**(**6**), 74–78.
99. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, **33**(**7**), 1870–1874.
100. Edited by Dongyou Liu, Liu D., Russmann H., et al. (2013), *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
101. Cai X.Q., Yu H.Q., Bai J.S., et al. (2012). Development of a TaqMan based real-time PCR assay for detection of Clonorchis sinensis DNA in human stool samples and fishes. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 183–186.
102. Qian M.-B. (2014). Clonorchiasis control: Starting from awareness. *Infect Dis Poverty*, **3**(**1**), 33.
103. Liu D., Chansiri K., and Areekit S. (2012). Brugia. *Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens*. CRC Press, 521–528.
104. Montresor A., Cong D.T., Sinuon M., et al. (2008). Large-scale preventive chemotherapy for the control of helminth infection in Western Pacific countries: Six years later. .
105. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., et al. (2012). Opisthorchis felineus and Metorchis bilis are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 25–31.
106. Pakharukova M.Y. and Mordvinov V.A. (2015). The liver fluke

Opisthorchis felineus: Biology, epidemiology and carcinogenic potential. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **110**(**1**), 28–36.

107. Lun Z.-R.R., Gasser R.B., Lai D.-H.H., et al. (2005). Clonorchiasis: A key foodborne zoonosis in China. *Lancet Infect Dis*, **5**(**1**), 31–41.
108. Park D.-S.S., Na S.-J.J., Cho S.H., et al. (2014). Prevalence and risk factors of Clonorchiasis among residents of riverside areas in Muju-gun, Jeollabuk-do, Korea. *Korean J Parasitol*, **52**(**4**), 391–398.
109. Do T.D., Van De N., Waikagul J., et al. (2007). Fishborne zoonotic intestinal trematodes, Vietnam. *Emerg Infect Dis*, **13**(**12**), 1828–1833.
110. Bùi Ngọc Thanh, Nguyễn Thị Thu Bình và Phan Thị Vân (2014). Ấu trùng sán lá gan nhỏ (Clonorchis sinensis) trên cá mương (Hemiculter sp.) và cá thiểu (Cultrichthys erythropterus) tại Gia Viễn, Ninh Bình. *Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, **2**, 80–86.
111. Wongratanacheewin S., Pumidonming W., Sermswan R.W., et al. (2001). Development of a PCR-based method for the detection of Opisthorchis viverrini in experimentally infected hamsters. *Parasitology*, **122**(**2**), 175–180.
112. Sato M., Thaenkham U., Dekumyoy P., et al. (2009). Discrimination of O. viverrini, C. sinensis, H. pumilio and H. taichui using nuclear DNA-based PCR targeting ribosomal DNA ITS regions. *Acta Trop*, **109**(**1**), 81–3.
113. Hong S.-J.J., Lee Y.-H.H., Chung M.-H.H., et al. (1994). Egg positive rates of Clonorchis sinensis and intestinal helminths among residents in Kagye-ri, Saengbiryang-myon, Sanchong-gun, Kyongsangnam-do. *Korean J Parasitol*, **32**(**4**), 271–273.
114. Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa và Nguyễn Văn Chương (2005). So sánh chuỗi gen cox1 hệ gen ty thể của sán lá gan bé Clonorchis sinensis và Opisthorchis viverrini trên người Việt Nam. *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, (**1**), 86–91.

115. Kim Văn Vạn, Lê Thanh Hòa, Nguyễn Thị Bích Nga, Nguyễn Thị Tuyết Nhung và cộng sự (2007). Phân biệt sán lá ruột nhỏ Haplorchis taichui và H. pumilio với các loài sán khác sử dụng chỉ thị ITS-2 (Internal Transcribed Spacer). *Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp*, **4**(**1**), 36–42.
116. Skovgaard N. (2003). Foodborne Pathogens. Hazards, risk analysis and control. *Int J Food Microbiol*, **85**(**1**–**2**), 204.
117. Wongsawad C. and Wongsawad P. (2012). Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui: Development of a multiplex PCR assay for their detection and differentiation using specific primers derived from HAT-RAPD. *Exp Parasitol*, **132**(**2**), 237–242.
118. Thaenkham U., Visetsuk K., Dung D.T., et al. (2007). Discrimination of Opisthorchis viverrini from Haplorchis taichui using COI sequence marker. *Acta Trop*, **103**(**1**), 26–32.
119. Kang S., Sultana T., Loktev V.B., et al. (2008). Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda). *Parasitol Int*, **57**(**2**), 191–197.
120. Traub R.J., Macaranas J., Mungthin M., et al. (2009). A new PCR-based approach indicates the range of Clonorchis sinensis now extends to central Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*, **3**(**1**).
121. Wongsawad C., Phalee A., Noikong W., et al. (2012). Co-infection with Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui detected by human fecal examination in Chomtong district, Chiang Mai Province, Thailand. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 56–59.
122. Rahman S.M.M., Bae Y.M., Hong S.T., et al. (2011). Early detection and estimation of infection burden by real-time PCR in rats experimentally infected with Clonorchis sinensis. *Parasitol Res*, **109**(**2**), 297–303.
123. Park G.M. (2007). Genetic comparison of liver flukes, Clonorchis sinensis and Opisthorchis viverrini, based on rDNA and mtDNA gene

sequences. *Parasitol Res*, **100**(**2**), 351–357.

124. Lovis L., Mak T.K., Phongluxa K., et al. (2009). PCR diagnosis of Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys. *J Clin Microbiol*, **47**(**5**), 1517–1523.
125. Ngô Thị Hương và cộng sự (2006). Giám định loài sán lá gan nhỏ Opisthorchis viverrini ở Bình Định và Phú Yên bằng chỉ thị di truyền hệ gen ty thể. *Tạp chí Y học Việt Nam*, **9**, 47–53.
126. Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hòa và Nguyễn Thị Hợp. (2006). Xác định loài sán lá ruột nhỏ ký sinh trên người Việt Nam. *Tạp chí Y học thực hành*, **9**, 65–68.
127. Nguyễn Văn Đề và Lê Thanh Hòa (2011). Human infections of fish-borne trematodes in Vietnam: Prevalence and molecular specific identification at an endemic commune in Nam Dinh province. *Exp Parasitol*, **129**(**4**).
128. Nguyễn Thu Hương và Trần Thanh Dương (2013). Nghiên cứu mô tả trường hợp bệnh sán lá gan nhỏ lạc chỗ hiếm gặp bằng phương pháp sinh học phân tử tại Hà Nội. *Tạp chí Y học thực hành*, **88**(**6**), 57–62.
129. Nguyễn Văn Chương, Bùi Văn Tuấn và Huỳnh Hồng Quang. (2014). Định loài sán lá gan nhỏ nhiễm trên người bằng kỹ thuật PCR trên hệ gen ty thể tại Hưng Hóa - Quảng Trị. *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18**(**6**), 540–545.
130. Đỗ Trung Dũng (2014), *Nghiên cứu đặc điểm hình thái và phân tử sán lá ruột nhỏ trên người ở một số tỉnh và hiệu quả điều trị tại cộng đồng, năm 2010-2013*, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.
131. Madsen H., Dung B.T., The D.T., et al. (2015). The role of rice fields, fish ponds and water canals for transmission of fish-borne zoonotic trematodes in aquaculture ponds in Nam Dinh Province, Vietnam.

Parasites and Vectors, **8**(**1**).

132. Hà Ký và Bùi Quang Tề (2007). Ký sinh trùng trên cá nước ngọt Việt Nam. *Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội*.
133. Bowles J., Blair D., and McManus D.P. (1992). Genetic variants within the genus Echinococcus identified by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Biochem Parasitol*, **54**, 165–174.
134. Nguyễn Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Thị Hương Bình. và cộng sự (2018). Thực trạng và yếu tố nguy cơ nhiễm sán lá nhỏ tại một số xã của tỉnh Bắc Giang và Bình Định, năm 2016 - 2017. *Tạp chí Phòng chống Bệnh Sốt rét và các bệnh Ký sinh trùng*, **1**(**103**), 15–22.
135. Nguyễn Võ Hinh, Bùi Thị Lộc, Lương Văn Định. và cộng sự (2005). Tình hình nhiễm giun đường ruột ở trẻ em và vấn đề sử dụng nhà vệ sinh, nguồn nước sinh hoạt tại huyện A Lưới, Thừa Thiên – Huế năm 2004 – 2005. *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, **4**, 75–81.
136. Trần Đáng, Đặng Duy Quý và Đào Văn Dũng. (2006). Tập quán vệ sinh ăn uống ảnh hưởng đến sức khoẻ của người dân xã Tân Thành, huyện Kim Sơn, Ninh Bình. *Y học dự phòng*, **2**, 66–68.
137. Santarem V., Rubinsky-Elefant G., and Ferreira M. (2011). Soil-transmitted helminthic zoonoses in humans and associated risk factors. *Soil contamination*. InTech, 43–66.
138. Torgerson P.R. and Macpherson C.N.L. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Vet Parasitol*.
139. Kaewpitoon S.S.J.S., Rujirakul R., Wakkuwattapong P., et al. (2016). Implementation of health behavior education concerning liver flukes among village health volunteers in an epidemic area of Thailand. *Asian Pacific J Cancer Prev*, **17**(**4**), 1713–1716.
140. Zhou X.-N., Bergquist R., Olveda R., et al. (2010), *Important Helminth Infections in Southeast Asia, Volume 72: Diversity and Potential for Control and Elimination, Part A*, .

141. Hà Duy Ngọ và Tạ Huy Thịnh. (2005). Một số kết quả điều tra về bệnh sán lá gan nhỏ ở sáu xã thuộc hai tỉnh Nam Định và Ninh Bình. *Hội thảo quốc gia về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ nhất*, 789–792.
142. Vinh H.Q., Phimpraphai W., Tangkawattana S., et al. (2017). Risk factors for Clonorchis sinensis infection transmission in humans in northern Vietnam: A descriptive and social network analysis study. *Parasitol Int*, **66**(**2**), 74–82.
143. Motarjemi Y., Moy G.G., Todd E., et al. (2014), *Encyclopedia on Food Safety - Volume 1*, .
144. Crompton D.W.T. and Savioli L. (2006), *Handbook of Helminthiasis for Public Health*, Taylor & Francis CRC Press, London, England.
145. Trương Đình Bắc và Trịnh Hữu Vách. (2005). Một số hành vi vệ sinh người dân tại 3 huyện của Hà Giang và Tuyên Quang. *Y học thực hành*, **12**, 83–86.
146. Fan S., Shi X., Niu J., et al. (2014). [Investigation on Clonorchis sinensis infection and its risk factors in Futian District, Shenzhen City]. [Article in Chinese]. *[Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi]*, **26**(**6**), 699–700.
147. Hong S.S.-T.T. and Fang Y. (2012). Clonorchis sinensis and clonorchiasis, an update. *Parasitol Int*, **61**(**1**), 17–24.
148. Đặng Thị Cẩm Thạch, Phạm Văn Thân, Nguyễn Thị Hà và cộng sự (2005). Tình hình nhiễm và sự phân bố của Clonorchis sinensis trên thế giới và Việt Nam. *Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, **1**(**1**), 69-78.
149. Thach D.T.C., Yajima A., Viet K.N., et al. (2008). Prevalence, intensity and risk factor of Clonorchiasis and possible use of questionnaire to detect individuals at risk in northern Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **102**(**12**), 1263–1268.
150. Nguyễn Thị Thanh Huyền (2018). Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ

nhiễm sán lá gan nhỏ và hiệu quả can thiệp tại một số điểm thuộc tỉnh Bắc Giang và Bình Định năm 2016-2017. *Nimpe*.

151. Kim J.H., Choi M.H., Bae Y.M., et al. (2011). Correlation between discharged worms and fecal egg counts in human clonorchiasis. *PLoS Negl Trop Dis*, **5**(**10**), 4–9.
152. Lim J.H. (2011). Liver flukes: The malady neglected. *Korean J Radiol*, **12**(**3**), 269–279.
153. Lê Trần Anh và Nguyễn Khắc Lực (2013). Nhiễm giun sán từ động vật sang người được chẩn đoán tại bệnh viện 103 (2009 – 2013). *Y dược học quân sự*, **38**(**4/2013**), 29–34.
154. Xiao L., Ryan U., and Feng Y. (2015), *Foodborne Parasites*, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton London New York.
155. Cross J.H. (2001). Fish- and Invertebrate-Borne Helminths. *Foodborne Disease Handbook vol II: Viruses, Parasites, Pathogens, and Haccp*. Hui, Yiu H, CRC Press, Year: 2018, 249–288.
156. Han S., Zhang X., Wen J., et al. (2012). A Combination of the Kato-Katz Methods and ELISA to Improve the Diagnosis of Clonorchiasis in an Endemic Area, China. *PLoS One*, **7**(**10**), 1–8.
157. Qian M.-B.B., Chen Y.-D.D., Liang S., et al. (2012). The global epidemiology of clonorchiasis and its relation with cholangiocarcinoma. *Infect Dis Poverty*, **1**(**4**), 1–11.
158. Ju Y.-H.Y.Y.-H.Y.Y.-H., Oh J.J.-K., Kong H.H.-J.H., et al. (2005). [Epidemiologic study of Clonorchis sinensis infestation in a rural area of Kyongsangnam-do, South Korea]. *J Prev Med Public Health*, **38**(**4**), 425–42530.
159. Rangsin R., Mungthin M., Taamasri P., et al. (2009). Incidence and risk factors of Opisthorchis viverrini infections in a rural community in Thailand. *Am J Trop Med HygMed Hyg*, **81**(**1**), 152–5.
160. Kobayashi J., Vannachone B., Sato Y., et al. (2000). An epidemiological

study on Opisthorchis viverrini infection in Lao villages. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **31**(**1**), 128–132.

161. Murrell K.D. and Fried B., eds. (2007), *Food-Borne Parasitic Zoonoses Fish and Plant-Borne Parasites Series: World Class Parasites, Vol. 11*, Springer, New York.
162. Keiser J. and Utzinger J. (2005). Emerging foodborne trematodiasis. *Emerg Infect Dis*, **11**(**10**), 1507–1514.
163. Acha P.N. and Szyfres B. (2005). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume I. Bacterioses and mycoses. *PAHO Sci Tech Publ No 580*, **I**(**3rd edition**), 378pp.
164. Bui T.N., Pham T.T., Nguyen N.T., et al. (2016). The importance of wild fish in the epidemiology of Clonorchis sinensis in Vietnam. *Parasitol Res*, **115**(**9**), 3401–3408.
165. Wiriya B., Clausen J., Inpankaew T., et al. (2013). Fish-borne trematodes in cultured Nile tilapia (Oreochromis niloticus) and wild-caught fish from Thailand. *Vet Parasitol*, **198**(**1**–**2**), 230–4.
166. Cho S.H., Kim I.S., Hwang E.J., et al. (2012). Infection status of estuarine fish and oysters with intestinal fluke metacercariae in Muan-gun, Jeollanam-do, Korea. *Korean J Parasitol*, **50**(**3**), 215–220.
167. Vo D.T.T.T., Murrell D., Dalsgaard A., et al. (2008). Prevalence of zoonotic metacercariae in two species of grouper, Epinephelus coioides and Epinephelus bleekeri, and flathead mullet, Mugil cephalus,in Vietnam. *Korean J Parasitol*, **46**(**2**), 77–82.
168. Cai X.Q., Liu G.H., Song H.Q., et al. (2012). Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes Opisthorchis viverrini and Clonorchis sinensis (Trematoda). *Parasitol Res*, **110**(**1**), 235–243.
169. Buathong S., Leelayoova S., Mungthin M., et al. (2015). Development and evaluation of PCR methods based on cytochrome c oxidase subunit

one (cox1) and NADH dehydrogenase subunit one gene (nad1) to detect Opisthorchis viverrini in human fecal samples. *Parasitol Res*, **114**(**9**), 3547–9.

170. Le T.H., Nguyen N.T.B., Truong N.H., et al. (2012). Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke Opisthorchis viverrini (Opisthorchiidae; Trematoda; Platyhelminthes). *J Clin Microbiol*, **50**(**4**), 1178–1184.
171. Müller B., Schmidt J., and Mehlhorn H. (2007). PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchiidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specifc primers. *Parasitol Res*, **100**(**4**), 95–9.
172. Nguyễn Văn Đề (2006). Thực trạng nhiễm sán lá truyền qua cá trên người tại 2 xã thuộc Nam Định, Việt Nam 2005. *Tạp chí nghiên cứu Y học Việt Nam*, **46**(**6**), 164–167.
173. Roberts L., Schmidt G.D., and Jr. Janovy J. (2008). Digeneans: Plagiorchiformes and Opisthorchiformes. *Foundations of Parasitology*. 8th, McGraw-Hill Education.
174. Sato M., Pongvongsa T., Sanguankiat S., et al. (2010). Copro-DNA diagnosis of Opisthorchis viverrini and Haplorchis taichui infection in an endemic area of LAO PDR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **41**(**1**), 28–35.
175. Sohn W.M. (2009). Fish-borne zoonotic trematode metacercariae in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol*, **47**(**SUPPL.**), 103–114.
176. Nguyễn Văn đề và Lương Thị Phương Lan. (2012). Xác định loài sán lá gan nhỏ thu thập trên người và cá nước ngọt tại Nam Định. *Thông tin y dược*, **7**, 17–21.

PHỤ LỤC

Mã số:

PHIẾU ĐIỀU TRA KAP VỀ BỆNH SÁN LÁ NHỎ

Nơi điều tra: Thôn: Xã …….... Huyện ..... NB

Họ và tên người được phỏng vấn: Tuổi:

Giới: Trình độ học vấn: Nghề nghiệp:

Stt	Câu hỏi	Phương án trả lời		
1	Anh /chị đã sống ở địa phương này bao nhiêu năm rồi			
2	Nhà anh/ chị cách sông gần nhất là bao nhiêu km			
3	Anh, chị đã nghe nói về bệnh giun sán chưa?	☐ Có	☐ Chưa	
4	Anh chị hãy kể tên những loại giun sán mà anh, chị biết ?			
5	Theo anh chị giun sán nhiễm vào người qua những đường nào	☐ Do ăn rau sống ☐ Do uống nước lã ☐ Do tay bẩn ☐ Do ăn thịt/cá sống	☐ Hô hấp ☐ Chui qua da ☐ Muỗi đốt ☐ Đường khác (ví dụ)	
6	Theo anh chị ăn thịt/cá nấu chưa chín có bị nhiễm giun sán không	Có ☐	Không ☐	Không biết ☐
7	Nếu ăn thịt/cá nấu chưa chín có bị nhiễm giun sán thì nhiễm loại giun sán nào			
8	Theo anh chị những hành vi nào dễ nhiễm giun sán	☐ Ăn rau sống ☐ Uống nước lã ☐ Không rửa tay	☐ Đi chân đất ☐ Bị muỗi đốt ☐ Ăn thịt/cá sống	

		trước khi ăn	☐ Khác (ví dụ)
9	Anh/chị đã nghe nói về sán lá gan nhỏ chưa (nếu chưa chuyển câu 15)	☐ Có	☐ Chưa
10	Theo anh, chị đường lây nhiễm bệnh sán lá gan nhỏ qua con đường nào	☐ Qua ăn rau sống ☐ Sán xuyên qua da ☐ Ăn gỏi cá/cá nấu chưa chín	☐ Không biết ☐ Khác (ví dụ)
11	Theo anh, chị sán lá gan nhỏ gặp nhiều nhất ở đối tượng nào	☐ Nam giới ☐ Nữ giới	☐ Cả nam và nữ ☐ Không biết
12	Sán lá gan nhỏ gây những tác hại gì	☐ Đau bụng ☐ Đau vùng gan ☐ Sỏi mật ☐ Viêm đường mật ☐ Ung thư	☐ Ngứa/dị ứng ☐ Ỉa chảy ☐ Thiếu máu ☐ Khác (ví dụ)
13	Theo anh chị phòng bệnh sán lá gan nhỏ phải làm gì	☐ Ăn chín, uống sôi ☐ Không dùng phân tươi nuôi cá	☐ Không biết ☐ Khác (ví dụ)
14	Nếu bị bệnh sán lá gan nhỏ anh chị sẽ làm gì	☐ Để tự khỏi ☐ Đi khám BS	☐ Tự mua thuốc ☐ Khác (ví dụ)
15	Theo anh chị cần làm gì để	☐ Không ăn rau sống	☐ Không đi chân đất

	phòng bệnh giun sán, ký sinh trùng đường ruột	☐ Không uống nước lã ☐ Rửa tay trước khi ăn ☐ Đi ngoài vào nhà vệ sinh	☐ Tránh muỗi đốt ☐ Không ăn thịt/cá sống ☐ Khác:
16	Nếu biết ăn gỏi cá bị nhiễm bệnh nguy hiểm, anh/ chị có tiếp tục ăn không	☐ Vẫn ăn ☐ Không ăn	☐ Giảm số lần ăn ☐ Khác (ví dụ)
17	Anh, chị đã từng bị những triệu chứng/bệnh sau chưa	☐ Đau bụng ☐ Đau vùng gan ☐ Sỏi mật ☐ Viêm đường mật ☐ Tiêu chảy kéo dài	☐ Ngứa/dị ứng ☐ Đầy bụng, khó tiêu ☐ Thiếu máu ☐ Ung thư ☐ Khác (ví dụ)
18	Nếu có những triệu chứng trên thì anh/chị đã điều trị ở đâu	☐ Bệnh viện ☐ Trạm y tế ☐ Y tế tư nhân	☐ Tự mua thuốc ☐ Khác (ví dụ)
19	Lần điều trị gần nhất (thời gian)		
20	Nguồn nước nhà anh chị sử dụng là gì	☐ Nước máy ☐ Giếng khoan ☐ Nước giếng khơi	☐ Nước ao, hồ ☐ Nước sông ☐ Nguồn khác

		☐ Nước mưa	
21	Gia đình của anh/chị có nhà vệ sinh (hố xí) không?	☐ Có	☐ Không
22	Nhà vệ sinh (hố xí) nhà anh/chị thuộc loại nào?	☐ 1 ngăn ☐ 2 ngăn	☐ tự hoại ☐ khác
23	Gia đình có ao thả cá không	☐ Có	☐ Không
24	Gia đình có dùng phân người để thả xuống ao nuôi cá không?	☐ Có	☐ Không
25	Gia đình có dùng phân động vật để thả xuống ao nuôi cá không?	☐ Có	☐ Không
26	Anh/chị có chắc chắn ao không bị nhiễm phân không	☐ Có ☐ Không ☐ Không chắc chắn	
27	Nhà anh chị có nuôi động vật không	☐ Chó ☐ Mèo	☐ Lợn ☐ Khác
28	Chó nhà anh chị đi vệ sinh vào chỗ riêng hay đi tự do	☐ Vào chỗ riêng ☐ Đi tự do	☐ Cả hai
29	Mèo nhà anh chị đi vệ sinh vào chỗ riêng hay đi tự do	☐ Vào chỗ riêng ☐ Đi tự do	☐ Cả hai
30	Anh, chị đã từng ăn cá sống/nẫu chưa chín (gỏi) chưa?	☐ Có	☐ Chưa

31	Nếu có, anh chị ăn cá sống/nẫu chưa chín (gỏi) lần đầu tiên khi nào ? (khoảng năm bao nhiêu tuổi)			
32	Anh/chị có hay uống rượu không	Thường xuyên ☐	Thỉnh thoảng ☐	Không bao giờ ☐
33	Anh, chị thường ăn gỏi cá nào ?	Thường xuyên	Thỉnh thoảng	Không bao giờ
	Cá mòi	☐	☐	☐
	Cá mè	☐	☐	☐
	Cá khác	☐	☐	☐
34	Năm ngoái anh/chị ăn gỏi cá bao nhiêu lần	☐ 1 lần/tháng ☐ 2-3 lần/tháng	☐ 2- 3 lần /tuần ☐ hàng ngày	
35	Anh/chị ăn gỏi cá (cá sống) theo cách nào?	☐ cắt nhỏ cá thành mảnh ☐ ăn cả con	☐ cách khác (ví dụ)	
36	Có lý do đặc biệt nào để anh chị ăn gỏi cá không	☐ Uống rượu ☐ Tiếp khách ☐ Thích là ăn	☐ Đi ăn chiêu đãi ☐ Chiêu đãi khách ☐ Khác (ví dụ)	
37	Anh, chị thường ăn gỏi cá ở đâu	☐ Ở nhà ☐ Ở quán	☐ Nơi khác (ví dụ)	
38	Cá mà anh/chị ăn gỏi (ăn sống) thường lấy từ đâu?	☐ từ ao gia đình ☐ ao hàng xóm	☐ mua cá ở chợ ☐ Ở nơi khác (ví dụ)	

		☐ cá từ sông		
39	Khi ăn gỏi anh chị có biết nguồn gốc cá ở đâu không	☐ Ở sông ☐ Ở ao/hồ tự nhiên ☐ Không biết	☐ Ở ao nuôi ☐ Ở nơi khác (ví dụ)	
40	Anh chị có tự chế biến gỏi cá không	Thường xuyên	Thỉnh thoảng	Không bao giờ
		☐	☐	☐
41	Anh /chị thường rửa tay khi nào	Thường xuyên	Thỉnh thoảng	Không bao giờ
	Trước khi ăn	☐	☐	☐
	Sau khi đi ngoài	☐	☐	☐
	Trước khi chế biến món ăn	☐	☐	☐
	Sau khi chế biến gỏi cá	☐	☐	☐
	Sau khi chế biến món ăn	☐	☐	☐
	Khi bàn tay bẩn	☐	☐	☐
42	Tần suất anh /chị rửa tay xà phòng	Thường xuyên	Thỉnh thoảng	Không bao giờ
	Trước khi ăn	☐	☐	☐
	Sau khi đi ngoài	☐	☐	☐
	Trước khi chế biến món ăn	☐	☐	☐
	Sau khi chế biến món ăn	☐	☐	☐
	Khi bàn tay bẩn	☐	☐	☐

43	Anh chị có những hành vi sau	Thường xuyên	Thỉnh thoảng	Không bao giờ
	Ăn rau sống	☐	☐	☐
	Uống nước lã	☐	☐	☐
	Đi chân đất	☐	☐	☐
	Đi ngoài xuống sông, ao/hồ	☐	☐	☐
	Dùng riêng thớt cho thức ăn chín và thức ăn sống	☐	☐	☐
44	Anh/chị đã bị bệnh giun sán chưa	☐ Có		☐ Chưa
45	Nếu có, là loại gì			
46	Lần điều trị giun sán gần nhất			
47	Thuốc gì			
48	Điều trị ở đâu	☐ Bệnh viện ☐ Trạm y tế ☐ Y tế tư nhân		☐ Tự mua thuốc ☐ Khác (ví dụ)
49	Những thông tin mà anh, chị biết về bệnh giun sán từ nguồn nào	☐ Đài ☐ TV ☐ Báo, sách ☐ Tờ rơi, quảng cáo		☐ Cán bộ y tế ☐ Người quen ☐ Khác (ví dụ)

50	Theo anh chị nên tuyên truyền thông tin về sức khỏe qua kênh nào	☐ Đài ☐ TV ☐ Báo, sách ☐ Tờ rơi, quảng cáo	☐ Cán bộ y tế ☐ Người quen ☐ Khác (ví dụ)

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Văn H	60	Xóm 7 – Khánh Thủy	
2	Phạm Văn Tr	28	Xóm 7 – Khánh Thủy	
3	Nguyễn Thị H	25	Xóm 7 – Khánh Thủy	
4	Lương Thị Th	33	Xóm 7 – Khánh Thủy	
5	Bùi Thị Ng	48	Xóm 7 – Khánh Thủy	
6	Nguyễn Thị T	27	Xóm 7 – Khánh Thủy	
7	Nguyễn Thị Tr	30	Xóm 7 – Khánh Thủy	
8	Nguyễn Thị H	45	Xóm 7 – Khánh Thủy	
9	Trần Quốc S	70	Xóm 7 – Khánh Thủy	
10	Nguyễn Văn Q	59	Xóm 7 – Khánh Thủy	
11	Phạm Thị M	57	Xóm 7 – Khánh Thủy	
12	Vũ Văn Kh	54	Xóm 7 – Khánh Thủy	
13	Vũ văn T	46	Xóm 7 – Khánh Thủy	
14	Nguyễn Thị S	45	Xóm 7 – Khánh Thủy	
15	Nguyễn Văn T	60	Xóm 7 – Khánh Thủy	
16	Tô Thị Th	55	Xóm 7 – Khánh Thủy	
17	Nguyễn Văn V	55	Xóm 7 – Khánh Thủy	
18	Lữ Văn T	57	Xóm 7 – Khánh Thủy	
19	Phạm văn Đ	27	Xóm 7 – Khánh Thủy	
20	Nguyễn Văn R	37	Xóm 7 – Khánh Thủy	
21	Nguyễn Văn L	40	Xóm 7 – Khánh Thủy	
22	Trần Văn T	41	Xóm 7 – Khánh Thủy	
23	Nguyễn Văn H	25	Xóm 7 – Khánh Thủy	
24	Phạm Văn T	37	Xóm 7 – Khánh Thủy	
25	Nguyễn Văn Đ	37	Xóm 7 – Khánh Thủy	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
26	Nguyễn Văn Q	55	Xóm 7 – Khánh Thủy	
27	Nguyễn Thị B	40	Xóm 7 – Khánh Thủy	
28	Nguyễn Thị T	55	Xóm 7 – Khánh Thủy	
29	Phạm Thị Ng	35	Xóm 7 – Khánh Thủy	
30	Phạm Thị L	25	Xóm 7 – Khánh Thủy	
31	Trương Văn H		Xóm 6 – Khánh Thủy	
32	Phan Văn T	52	Xóm 6 – Khánh Thủy	
33	Lê Văn H	46	Xóm 6 – Khánh Thủy	
34	Lê Thị Th	46	Xóm 6 – Khánh Thủy	
35	Phạm Thị Phương D	40	Xóm 6 – Khánh Thủy	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Lê Văn Th	69	Xóm 6 – Khánh Thủy	
2	Bùi Thị Kim D	30	Xóm 6 – Khánh Thủy	
3	Phạm Văn K	45	Xóm 6 – Khánh Thủy	
4	Trương Văn K	47	Xóm 6 – Khánh Thủy	
5	Phạm Thị X	36	Xóm 6 – Khánh Thủy	
6	Phạm Văn T	38	Xóm 6 – Khánh Thủy	
7	Phạm Văn T	42	Xóm 6 – Khánh Thủy	
8	Trương Văn Q	37	Xóm 6 – Khánh Thủy	
9	Trương Văn Ph	64	Xóm 6 – Khánh Thủy	
10	Phạm Văn H	43	Xóm 6 – Khánh Thủy	
11	Lê Văn K	58	Xóm 6 – Khánh Thủy	
12	Chu Thị Thu H	58	Xóm 6 – Khánh Thủy	
13	Lê Văn L	38	Xóm 6 – Khánh Thủy	
14	Lê Thị L	39	Xóm 6 – Khánh Thủy	
15	Lê Văn Th	42	Xóm 6 – Khánh Thủy	
16	Phạm Văn Ch	54	Xóm 6 – Khánh Thủy	
17	Lê Văn L	70	Xóm 6 – Khánh Thủy	
18	Lê Văn K	50	Xóm 6 – Khánh Thủy	
19	Nguyễn Văn Q	32	Xóm 6 – Khánh Thủy	
20	Bùi Văn T	46	Xóm 6 – Khánh Thủy	
21	Bùi Thị Nh	20	Xóm 6 – Khánh Thủy	
22	Bùi Tuấn Ph	24	Xóm 6 – Khánh Thủy	
23	Phạm Thị Th	46	Xóm 6 – Khánh Thủy	
24	Lê Văn Ch	58	Xóm 6 – Khánh Thủy	
25	Lê Văn T	55	Xóm 6 – Khánh Thủy	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
26	Lê Thị H	30	Xóm 5 – Khánh Thủy	
27	Lê Văn T	55	Xóm 5 – Khánh Thủy	
28	Đỗ Thị M	53	Xóm 5 – Khánh Thủy	
29	Đỗ Văn M	54	Xóm 5 – Khánh Thủy	
30	Tô Thị H	50	Xóm 5 – Khánh Thủy	
31	Đỗ Văn S	25	Xóm 5 – Khánh Thủy	
32	Đỗ Văn T	54	Xóm 5 – Khánh Thủy	
33	Phạm Thị S	46	Xóm 5 – Khánh Thủy	
34	Đỗ Việt B	47	Xóm 5 – Khánh Thủy	
35	Phạm Thị H	40	Xóm 5 – Khánh Thủy	
36	Đỗ Xuân Th	31	Xóm 5 – Khánh Thủy	
37	Nguyễn Thị D	30	Xóm 5 – Khánh Thủy	
38	Đỗ Thị Nh	53	Xóm 5 – Khánh Thủy	
39	Đỗ Văn Ph	51	Xóm 5 – Khánh Thủy	
40	Lại Thị T	50	Xóm 5 – Khánh Thủy	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Ngô Thị Th	41	Xóm 5 – Khánh Thủy	
2	Nguyễn Văn K	67	Xóm 3 – Khánh Thủy	
3	Phạm Thị Nh	66	Xóm 3 – Khánh Thủy	
4	Lê Văn T	36	Xóm 3 – Khánh Thủy	
5	Đỗ Văn M	64	Xóm 3 – Khánh Thủy	
6	Đỗ Văn U	70	Xóm 3 – Khánh Thủy	
7	Lê Thị C	65	Xóm 3 – Khánh Thủy	
8	Đỗ Giang N	36	Xóm 3 – Khánh Thủy	
9	Lê Thị D	32	Xóm 3 – Khánh Thủy	
10	Phạm Văn C	65	Xóm 3 – Khánh Thủy	
11	Vũ Văn Đ	35	Xóm 5 – Khánh Thủy	
12	Vũ Thị Th	37	Xóm 5 – Khánh Thủy	
13	Đỗ Thị T	24	Xóm 5 – Khánh Thủy	
14	Trần Văn Th	31	Xóm 5 – Khánh Thủy	
15	Đỗ Văn S	48	Xóm 5 – Khánh Thủy	
16	Đinh Thị V	47	Xóm 5 – Khánh Thủy	
17	Lê Văn Đ	42	Xóm 5 – Khánh Thủy	
18	Nguyễn Thị Nh	43	Xóm 5 – Khánh Thủy	
19	Vũ Thị V	45	Xóm 5 – Khánh Thủy	
20	Nguyễn Văn V	46	Xóm 5 – Khánh Thủy	
21	Nguyễn Thị N	58	Xóm 5 – Khánh Thủy	
22	Nguyễn Văn G	55	Xóm 5 – Khánh Thủy	
23	Phạm Thị M	64	Xóm 5 – Khánh Thủy	
24	Nguyễn Văn Th	29	Xóm 5 – Khánh Thủy	
25	Phạm Thị H	56	Xóm 5 – Khánh Thủy	

DANH SÁCH

Người cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Trần Mạnh H	56	Xóm 17 – Khánh Thành	
2	Vũ Văn Th	64	Xóm 17 – Khánh Thành	
3	Nguyễn Thị Th	42	Xóm 19 – Khánh Thành	
4	Nguyễn Văn C	47	Xóm 11 – Khánh Thành	
5	Trương Công M	57	Xóm 11 – Khánh Thành	
6	Phạm Văn H	60	Xóm 11 – Khánh Thành	
7	Nguyễn Thị T	49	Xóm 11 – Khánh Thành	
8	Hoàng Văn D	34	Xóm 10 – Khánh Thành	
9	Hoàng Văn H	56	Xóm 10 – Khánh Thành	
10	Phạm Văn Ch	32	Xóm 10 – Khánh Thành	
11	Đỗ Văn Q	50	Xóm 10 – Khánh Thành	
12	Hoàng Minh Th	42	Xóm 10 – Khánh Thành	
13	Nguyễn Văn L	54	Xóm 10 – Khánh Thành	
14	Phạm Văn N	49	Xóm 7 – Khánh Thành	
15	Trần Văn Kh	35	Xóm 7 – Khánh Thành	
16	Phạm Văn L	58	Xóm 7 – Khánh Thành	
17	Phạm Văn B	45	Xóm 7 – Khánh Thành	
18	Phạm Cảnh T	64	Xóm 7 – Khánh Thành	
19	Nguyễn Thị D	40	Xóm 7 – Khánh Thành	
20	Đỗ Thị L	52	Xóm 9 – Khánh Thành	
21	Nguyễn Văn D	47	Xóm 9 – Khánh Thành	
22	Nguyễn Văn T	50	Xóm 9 – Khánh Thành	
23	Hoàng Văn H	59	Xóm 9 – Khánh Thành	
24	Nguyễn Văn Th	49	Xóm 9 – Khánh Thành	
25	Hoàng thị T	60	Xóm 16 – Khánh Thành	

DANH SÁCH

Người cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Phạm Văn K	48	Xóm 14 – Khánh Thành	
2	Nguyễn Thị H	45	Xóm 14 – Khánh Thành	
3	Bùi Thị Th	35	Xóm 14 – Khánh Thành	
4	Hoàng Thị T	55	Xóm 14 – Khánh Thành	
5	Đỗ Văn H	46	Xóm 14 – Khánh Thành	
6	Đỗ Văn Đ	38	Xóm 14 – Khánh Thành	
7	Nguyễn Văn T	61	Xóm 4 – Khánh Thành	
8	Phạm Văn Th	35	Xóm 4 – Khánh Thành	
9	Nguyễn Văn B	56	Xóm 4 – Khánh Thành	
10	Phạm Văn K	66	Xóm 4 – Khánh Thành	
11	Nguyễn Văn Th	36	Xóm 4 – Khánh Thành	
12	Nguyễn Văn B	65	Xóm 4 – Khánh Thành	
13	Nguyễn Văn T	63	Xóm 4 – Khánh Thành	
14	Trần Văn T	43	Xóm 3 – Khánh Thành	
15	Phạm Văn H	45	Xóm 3 – Khánh Thành	
16	Phạm Văn T	72	Xóm 3 – Khánh Thành	
17	Phạm Văn V	52	Xóm 3 – Khánh Thành	
18	Phạm Văn Th	45	Xóm 3 – Khánh Thành	
19	Phạm Văn X	42	Xóm 3 – Khánh Thành	
20	Phạm Văn Đ	49	Xóm 8 – Khánh Thành	
21	Phạm Cao Q	32	Xóm 8 – Khánh Thành	
22	Phạm Văn Th	57	Xóm 8 – Khánh Thành	
23	Phạm Văn X	58	Xóm 8 – Khánh Thành	
24	Bùi Thị V	45	Xóm 17 – Khánh Thành	
25	Lê Văn H	47	Xóm 17 – Khánh Thành	
26	Phạm Văn M	38	Xóm 17 – Khánh Thành	

DANH SÁCH

Người cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Trần Văn L	55	Xóm 16 – Khánh Thành	
2	Phạm Xuân V	49	Xóm 16 – Khánh Thành	
3	Đỗ Văn H	62	Xóm 16 – Khánh Thành	
4	Đỗ Văn C	65	Xóm 16 – Khánh Thành	
5	Đỗ Thị B	59	Xóm 16 – Khánh Thành	
6	Phạm Văn D	50	Xóm 16 – Khánh Thành	
7	Đỗ Văn C	54	Xóm 16 – Khánh Thành	
8	Lại Văn H	45	Xóm 2 – Khánh Thành	
9	Đỗ Văn T	52	Xóm 1 – Khánh Thành	
10	Nguyễn Văn Ch	34	Xóm 1 – Khánh Thành	
11	Phạm Văn Đ	54	Xóm 1 – Khánh Thành	
12	Phạm Thanh H	65	Xóm 1 – Khánh Thành	
13	Phạm Văn T	54	Xóm 1 – Khánh Thành	
14	Phạm Văn Ch	59	Xóm 1 – Khánh Thành	
15	Phạm Thị G	57	Xóm 2 – Khánh Thành	
16	Nguyễn Văn D	59	Xóm 2 – Khánh Thành	
17	Nguyễn Văn K	52	Xóm 2 – Khánh Thành	
18	Phạm Văn H	40	Xóm 2 – Khánh Thành	
19	Nguyễn Văn K	43	Xóm 2 – Khánh Thành	
20	Nguyễn Văn B	43	Xóm 2 – Khánh Thành	
21	Phạm Văn H	30	Xóm 2 – Khánh Thành	
22	Nguyễn Thị H	58	Xóm 6– Khánh Thành	
23	Phạm Văn H	49	Xóm 6– Khánh Thành	
24	Nguyễn Thị M	44	Xóm 6– Khánh Thành	
25	Nguyễn Văn H	56	Xóm 5 – Khánh Thành	

DANH SÁCH

Người cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Thị Th	52	Xóm 5 – Khánh Thành	
2	Hoàng Thị G	60	Xóm 5 – Khánh Thành	
3	Nguyễn Văn H	58	Xóm 5 – Khánh Thành	
4	Đào Thị H	47	Xóm 5 – Khánh Thành	
5	Phạm Thị B	44	Xóm 5 – Khánh Thành	
6	Nguyễn Văn Tr	49	Xóm 5 – Khánh Thành	
7	Đỗ Thị L	40	Xóm 5 – Khánh Thành	
8	Trần Thị Minh N	19	Xóm 5 – Khánh Thành	
9	Phạm Thị Nh	50	Xóm 9 – Khánh Thành	
10	Nguyễn Văn Kh	43	Xóm 15 – Khánh Thành	
11	Phạm Thị M	45	Xóm 15 – Khánh Thành	
12	Đỗ Hoàng H	57	Xóm 15 – Khánh Thành	
13	Đỗ Văn Ng	27	Xóm 15 – Khánh Thành	
14	Phạm Ngọc Th	51	Xóm 15 – Khánh Thành	
15	Phạm Thị H	35	Khánh Thành	
16	Đỗ Thị H	41	Khánh Thành	
17	Đỗ Cồng Tr	42	Khánh Thành	
18	Bùi Ngọc Th	48	Khánh Thành	
19	Phạm văn Th	60	Khánh Thành	
20	Phạm Văn Ch	49	Khánh Thành	
21	Trương Văn H	37	Khánh Thành	
22	Phạm Văn H	34	Khánh Thành	
23	Nguyễn Văn Tr	39	Khánh Thành	
24	Nguyễn Văn Ch	60	Khánh Thành	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Hoàng văn L	49	Xóm 1 – Kim Đông	
2	Nguyễn Văn T	34	Xóm 1 – Kim Đông	
3	Nguyễn Đức D	49	Xóm 1 – Kim Đông	
4	Phạm Văn Đ	37	Xóm 1 – Kim Đông	
5	Mai Đức V	55	Xóm 1 – Kim Đông	
6	Nguyễn Văn Ph	35	Xóm 1 – Kim Đông	
7	Đinh Văn D	43	Xóm 1 – Kim Đông	
8	Phạm Đức T	37	Xóm 1 – Kim Đông	
9	Trần Anh Q	30	Xóm 1 – Kim Đông	
10	Trần Hữu N	60	Xóm 1 – Kim Đông	
11	Trần Thanh Kh	33	Xóm 1 – Kim Đông	
12	Trần Xuân Th	52	Xóm 1 – Kim Đông	
13	Mai Văn X	54	Xóm 1 – Kim Đông	
14	Ngô Văn M	41	Xóm 1 – Kim Đông	
15	Bùi Ngọc T	57	Xóm 1 – Kim Đông	
16	Trần Thị S	47	Xóm 1 – Kim Đông	
17	Nguyễn Văn Q	47	Xóm 1 – Kim Đông	
18	Trần Văn Q	50	Xóm 1 – Kim Đông	
19	Phạm Văn T	41	Xóm 1 – Kim Đông	
20	Trần Thị G	38	Xóm 1 – Kim Đông	
21	Trần Văn V	53	Xóm 1 – Kim Đông	
22	Phạm Thị Q	47	Xóm 1 – Kim Đông	
23	Trần Văn T	34	Xóm 1 – Kim Đông	
24	Phạm Văn N	40	Xóm 1 – Kim Đông	
25	Nguyễn Văn D	49	Xóm 1 – Kim Đông	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Văn T	52	Xóm 1 – Kim Đông	
2	Lê Đình Ch	53	Xóm 1 – Kim Đông	
3	Nguyễn Thế V	58	Xóm 1 – Kim Đông	
4	Nguyễn Văn T	35	Xóm 1 – Kim Đông	
5	Trần Thanh L	60	Xóm 1 – Kim Đông	
6	Trần Văn H	30	Xóm 1 – Kim Đông	
7	Định Thị S	33	Xóm 1 – Kim Đông	
8	Lai Thế D	20	Xóm 1 – Kim Đông	
9	Nguyễn Thị Th	57	Xóm 1 – Kim Đông	
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Phạm Văn M	53	Xóm 4 – Kim Đông	
2	Phạm Thị H	43	Xóm 4 – Kim Đông	
3	Phạm Văn T	24	Xóm 4 – Kim Đông	
4	Mai Giang N	18	Xóm 4 – Kim Đông	
5	Trần Thị T	45	Xóm 4 – Kim Đông	
6	Nguyễn Văn K	53	Xóm 4 – Kim Đông	
7	Lương Thị C	30	Xóm 4 – Kim Đông	
8	Doãn Thị S	59	Xóm 4 – Kim Đông	
9	Đinh Văn T	53	Xóm 4 – Kim Đông	
10	Phạm Thị H	51	Xóm 4 – Kim Đông	
11	Trần Thị Th	43	Xóm 4 – Kim Đông	
12	Nguyên Văn Q	54	Xóm 4 – Kim Đông	
13	Lê Thị B	51	Xóm 4 – Kim Đông	
14	Ngô Văn T	35	Xóm 4 – Kim Đông	
15	Trần Thị Ng	29	Xóm 4 – Kim Đông	
16	Hoàng Văn Th	50	Xóm 4 – Kim Đông	
17	Vũ Thị Th	37	Xóm 4 – Kim Đông	
18	Đinh Thị Ch	55	Xóm 4 – Kim Đông	
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Văn T	51	Xóm 4 – Kim Đông	
2	Phạm Thị Y	48	Xóm 4 – Kim Đông	
3	Hoàng Văn S	45	Xóm 4 – Kim Đông	
4	Nguyên Thị Th	44	Xóm 4 – Kim Đông	
5	Hoàng Văn Th	51	Xóm 4 – Kim Đông	
6	Vũ Thị Th	37	Xóm 4 – Kim Đông	
7	Phạm Văn L	47	Xóm 4 – Kim Đông	
8	Vũ Thị H	45	Xóm 4 – Kim Đông	
9	Nguyễn Văn C	54	Xóm 4 – Kim Đông	
10	Đào Thị Th	52	Xóm 4 – Kim Đông	
11	Nguyễn Văn D	27	Xóm 4 – Kim Đông	
12	Định Văn H	43	Xóm 4 – Kim Đông	
13	Phạm Thị B	37	Xóm 4 – Kim Đông	
14	Nguyễn Văn H	46	Xóm 4 – Kim Đông	
15	Mai Thị D	45	Xóm 4 – Kim Đông	
16	Nguyễn Văn Th	15	Xóm 4 – Kim Đông	
17	Đih Văn T	56	Xóm 4 – Kim Đông	
18	Trân Thị L	53	Xóm 4 – Kim Đông	
19	Trần Văn T	53	Xóm 4 – Kim Đông	
20	Cao Thị S	51	Xóm 4 – Kim Đông	
21	Lê Văn Ch	43	Xóm 4 – Kim Đông	
22	Nguyễn Thị H	39	Xóm 4 – Kim Đông	
23	Rương Văn Th	41	Xóm 4 – Kim Đông	
24	Cù Thị L	38	Xóm 4 – Kim Đông	
25	Nguyễn Thị L	47	Xóm 4 – Kim Đông	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Phạm Đức D	60	Xóm 2 – Kim Đông	
2	Vũ Thị Ng	57	Xóm 2 – Kim Đông	
3	Phạm Văn N	24	Xóm 2 – Kim Đông	
4	Hoàng Văn L	52	Xóm 2 – Kim Đông	
5	Ngô Thị Th	48	Xóm 2 – Kim Đông	
6	Nguyễn Xuân Tr	30	Xóm 2 – Kim Đông	
7	Trần Thị Y	27	Xóm 2 – Kim Đông	
8	Định Văn H	48	Xóm 2 – Kim Đông	
9	Nguyễn Thị H	49	Xóm 2 – Kim Đông	
10	Nguyễn Xuân Q	55	Xóm 2 – Kim Đông	
11	Tạ Thị L	53	Xóm 2 – Kim Đông	
12	Trần Văn P	58	Xóm 2 – Kim Đông	
13	Vũ Thị S	57	Xóm 2 – Kim Đông	
14	Nguyễn Văn L	45	Xóm 2 – Kim Đông	
15	Trương Văn B	49	Xóm 2 – Kim Đông	
16	Định Văn D	40	Xóm 2 – Kim Đông	
17	Nguyễn Thị O	56	Xóm 2 – Kim Đông	
18	Bũi Văn Ph	48	Xóm 2 – Kim Đông	
19	Bùi Thị T	32	Xóm 2 – Kim Đông	
20	Phạm Văn P	50	Xóm 2 – Kim Đông	
21	Nguyễn Thị M	49	Xóm 2 – Kim Đông	
22	Vũ Thị S	51	Xóm 2 – Kim Đông	
23	Nguyễn Thị Th	40	Xóm 2 – Kim Đông	
24				
25				

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Trần Văn H	15	Xóm 11 – Kim Tân	
2	Trần Thị Th	44	Xóm 11 – Kim Tân	
3	Tô Văn B	56	Xóm 11 – Kim Tân	
4	Nguyễn Thị N	52	Xóm 11 – Kim Tân	
5	Trần Văn Q	28	Xóm 11 – Kim Tân	
6	Trần Thị T	30	Xóm 11 – Kim Tân	
7	Phạm Văn L	56	Xóm 11 – Kim Tân	
8	Trần Thị Nh	55	Xóm 11 – Kim Tân	
9	Phạm Minh Ch	62	Xóm 11 – Kim Tân	
10	Nguyễn Thị T	54	Xóm 11 – Kim Tân	
11	Nguyễn Văn D	61	Xóm 11 – Kim Tân	
12	Phạm Thị H	57	Xóm 11 – Kim Tân	
13	Nguyễn Văn Ch	39	Xóm 11 – Kim Tân	
14	Nguyễn Thị Th	31	Xóm 11 – Kim Tân	
15	Nguyễn Văn M	44	Xóm 11 – Kim Tân	
16	Phạm Thị L	40	Xóm 11 – Kim Tân	
17	Nguyễn Tuấn A	16	Xóm 11 – Kim Tân	
18	Lưu Văn T	33	Xóm 11 – Kim Tân	
19	Vũ Đức M	62	Xóm 11 – Kim Tân	
20	Trần Văn Ph	63	Xóm 11 – Kim Tân	
21	Lê Thị T	57	Xóm 11 – Kim Tân	
22	Trần Xuân Tr	29	Xóm 11 – Kim Tân	
23	Lưu Thị L	26	Xóm 11 – Kim Tân	
24	Đỗ Thị L	54	Xóm 11 – Kim Tân	
25	Nguyễn Văn P	50	Xóm 11 – Kim Tân	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Văn H	57	Xóm 12 – Kim Tân	
2	Nguyễn Thị D	58	Xóm 12 – Kim Tân	
3	Ngô Văn Q	69	Xóm 12 – Kim Tân	
4	Lưu Văn V	48	Xóm 7 – Kim Tân	
5	Trần Văn Th	56	Xóm 14 – Khánh Thành	
6	Nguyễn Thị L	52	Xóm 14 – Khánh Thành	
7	Trần Thị H	33	Xóm 12 – Kim Tân	
8	Trần Văn B	54	Xóm 12 – Kim Tân	
9	Nguyễn Thị K	50	Xóm 12 – Kim Tân	
10	Trân Thị H	40	Xóm 12 – Kim Tân	
11	Trịnh Thị H	46	Xóm 12 – Kim Tân	
12	Nguyễn Văn N	30	Xóm 12 – Kim Tân	
13	Nguyễn Văn T	40	Xóm 12 – Kim Tân	
14	Nguyễn Thị Th	62	Xóm 12 – Kim Tân	
15	Trần Văn C	35	Xóm 12 – Kim Tân	
16	Vũ Thị Ng	60	Xóm 12 – Kim Tân	
17	Trần Văn X	58	Xóm 12 – Kim Tân	
18	Nguyễn Thế T	50	Xóm 12 – Kim Tân	
19	Trần Văn Q	56	Xóm 12 – Kim Tân	
20	Ngô Thị H	44	Xóm 12 – Kim Tân	
21	Nguyễn Hùng S	16	Xóm 12 – Kim Tân	
22	Nguyễn văn N	16	Xóm 12 – Kim Tân	
23	Nguyễn Thị H	54	Xóm 12 – Kim Tân	
24	Trần Văn t	64	Xóm 12 – Kim Tân	
25	Trần Thị T	45	Xóm 12 – Kim Tân	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Nguyễn Văn Đ	45	Xóm 13 – Kim Tân	
2	Trần Thị X	40	Xóm 13 – Kim Tân	
3	Nguyễn Văn D	23	Xóm 13 – Kim Tân	
4	Nguyễn Xuân L	63	Xóm 13 – Kim Tân	
5	Phạm Thị D	62	Xóm 13 – Kim Tân	
6	Nguyễn văn L	22	Xóm 13 – Kim Tân	
7	Nguyễn Thị T	27	Xóm 13 – Kim Tân	
8	Vũ Thị D	55	Xóm 13 – Kim Tân	
9	Đỗ Văn M	55	Xóm 13 – Kim Tân	
10	Đỗ Văn Ch	61	Xóm 13 – Kim Tân	
11	Trần Thị X	64	Xóm 13 – Kim Tân	
12	Tô Đình Đ	55	Xóm 13 – Kim Tân	
13	Trần Thị X	52	Xóm 13 – Kim Tân	
14	Phạm Thị Th	49	Xóm 13 – Kim Tân	
15	Đỗ Văn Ch	51	Xóm 13 – Kim Tân	
16	Trần Văn L	44	Xóm 13 – Kim Tân	
17	Ngô Thị K	40	Xóm 13 – Kim Tân	
18	Trần Xuân Đ	56	Xóm 13 – Kim Tân	
19	Đỗ Thị G	56	Xóm 13 – Kim Tân	
20	Trần Văn B	30	Xóm 13 – Kim Tân	
21	Trần Văn K	32	Xóm 13 – Kim Tân	
22	Nguyễn Văn Th	57	Xóm 13 – Kim Tân	
23	Nguyễn Thị M	53	Xóm 13 – Kim Tân	
24	Tô Đình Ch	70	Xóm 13 – Kim Tân	
25	Nguyễn Thị H	68	Xóm 13 – Kim Tân	

DANH SÁCH

Đối tượng cung cấp thông tin, mẫu bệnh phẩm phục vụ đề tài: 'Nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học bệnh san sá gan nhỏ tại huyện Yên Khánh, Kim Sơn tỉnh Ninh Bình năm 2016 và đề xuất biện pháp phòng chống'

STT	Họ và tên	Tuổi	Địa chỉ	Ghi chú
1	Đỗ Thị M	33	Xóm 10 – Kim Tân	
2	Bùi Văn Đ	36	Xóm 10 – Kim Tân	
3	Trần Văn Th	53	Xóm 10 – Kim Tân	
4	Lê Thị B	53	Xóm 10 – Kim Tân	
5	Mai thị H	55	Xóm 10 – Kim Tân	
6	Bùi Văn Đ	47	Xóm 10 – Kim Tân	
7	Đỗ Thị Ng	42	Xóm 10 – Kim Tân	
8	Bùi Thị L	32	Xóm 10 – Kim Tân	
9	Nguyễn Thị H	17	Xóm 10 – Kim Tân	
10	Trần Văn L	38	Xóm 10 – Kim Tân	
11	Trần Văn Đ	64	Xóm 10 – Kim Tân	
12	Lê Thị H	58	Xóm 10 – Kim Tân	
13	Trần Văn Th	69	Xóm 10 – Kim Tân	
14	Trần Thị T	45	Xóm 10 – Kim Tân	
15	Nguyễn Thị M	47	Xóm 10 – Kim Tân	
16	Trần Thị M	43	Xóm 10 – Kim Tân	
17	Nguyễn Văn H	49	Xóm 10 – Kim Tân	
18	Nguyễn Văn Th	39	Xóm 10 – Kim Tân	
19	Trần Thị T	45	Xóm 10 – Kim Tân	
20	Trần Thị X	40	Xóm 10 – Kim Tân	
21	Nguyễn Văn T	47	Xóm 10 – Kim Tân	
22	Đỗ Văn H	37	Xóm 10 – Kim Tân	
23	Nguyễn Thị Th	40	Xóm 10 – Kim Tân	
24	Lê Thị L	42	Xóm 10 – Kim Tân	
25	Phạm văn Đ	33	Xóm 10 – Kim Tân	