

BỘ Y TẾ**BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ
BƯỚC ĐẦU ÁP DỤNG SINH HỌC PHÂN TỬ (KỸ THUẬT
PCR) ĐỂ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN LOÀI VÀ SỰ PHÂN BỐ
SÁN LÁ, SÁN DẬY THƯỜNG GẶP Ở VIỆT NAM**

Chủ nhiệm đề tài: **PGS.TS. Nguyễn Văn Đê**

Cơ quan chủ trì đề tài: Viện Sốt rét - KST- CT TU

Cấp quản lý đề tài: **Bộ Y tế**

Mã số đề tài:

Thời gian thực hiện đề tài: từ tháng 01 năm 2003 đến tháng
10 năm 2005

Tổng kinh phí thực hiện đề tài 240 triệu đồng

Trong đó, kinh phí sự nghiệp khoa học: 240 triệu đồng

Nguồn khác (nếu có)0..... triệu đồng

HÀ NỘI 2006

6089

579106

Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp bộ

1. Tên đề tài: **Bước đầu áp dụng sinh học phân tử (kỹ thuật PCR) để xác định thành phần loài và sự phân bố sán lá, sán dây thường gặp ở Việt Nam**
2. Chủ nhiệm đề tài: **PGS.TS. Nguyễn Văn Đê**
3. Cơ quan chủ trì đề tài: Viện Sốt rét - KST- CT TU
4. Cơ quan quản lý đề tài: **Bộ Y tế**
5. Thư ký đề tài: BS. Nguyễn Thị Hợp
6. Phó chủ nhiệm đề tài: TS. Lê Thanh Hoà
7. Danh sách những người thực hiện chính:
 - PGS.TS. Nguyễn Văn Đê
 - TS. Lê Thanh Hoà
 - BS. Nguyễn Thị Hợp
 - Ths. Nguyễn Thị Bích Nga
 - Ths. Lê Đức Đào
 - CN. Lê Văn Châu
 - CN. Đặng Thanh Sơn
 - BS. Đỗ Trung Dũng
8. Các đề tài nhánh (nếu có)
9. Thời gian thực hiện đề tài: từ tháng 01 năm 2003 đến tháng 10 năm 2005

NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

Cob : *Cytochrome oxidase b*

Cox1 : *Cytochrome oxidase 1*

DNA: Deoxyribonucleic acid

GB: Gen Bank (Ngân hàng Gen).

ITS2 : *Internal transcribed spacer 2*

ME : Minimum evolution index

Nad1 : *Nicotinamide dehydrogenase subunit 1*

PCR: Polymerase Chain Reaction

RNA: Ribonucleic acid

MỤC LỤC

| | |
|---------------------------------------------------------------------|----------|
| Phần A- Tóm tắt các kết quả nổi bật của đề tài : | 1 |
| - Mục tiêu nghiên cứu | |
| - Phương pháp đã được sử dụng trong nghiên cứu. | 1 |
| - Kết quả nghiên cứu | 1 |
| - Kết luận rút ra từ nghiên cứu | 2 |
| Phần B - Nội dung báo cáo chi tiết kết quả nghiên cứu đề tài | 3 |
| 1. Đặt vấn đề | 3 |
| Mục tiêu nghiên cứu | 3 |
| 2. Tổng quan | 4 |
| 3. Nội dung và phương pháp nghiên cứu | 6 |
| 4. Kết quả nghiên cứu | 10 |
| 5. Bàn luận kết quả | 41 |
| 6. Kết luận | 43 |
| 7. Ý kiến đề xuất | 44 |
| 8. Tài liệu tham khảo | 44 |
| 9. Phụ lục | 46 |

Phần A - TÓM TẮT CÁC KẾT QUẢ NỔI BẬT CỦA ĐỀ TÀI

1. Mục tiêu nghiên cứu

1.1. Bước đầu áp dụng kỹ thuật PCR để xác định thành phần loài và sự phân bố của một số loài sán lá, sán dây thường gặp ở Việt Nam.

1.2. Nâng cao năng lực nghiên cứu sinh học phân tử của Viện Sốt rét-KST-CT TU

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu thập mẫu: sán lá gan, sán lá ruột và sán dây thu thập từ bệnh nhân bằng đũa phân khi điều trị; mẫu sán lá phổi từ đờm bệnh nhân khi điều trị; mẫu ấu trùng sán lợn bằng sinh thiết các nang sán dưới da. Ấu trùng sán lá gan, sán lá phổi thu thập từ cá, cua theo phương pháp tiêu cơ bằng pepsin acid; ấu trùng sán dây thu thập từ thịt lợn, trâu bò bằng bóc tách. Mẫu sán được rửa sạch bằng nước muối sinh lý và được cố định trong cồn 70%, bảo quản lạnh – 20°C, cho đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp xử lý mẫu: Tách chiết AND tổng số, tiến hành phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu bao gồm gen *cox1* (*cytochrome oxidase 1*) hoặc *cob* (*cytochrome oxidase b*) hoặc gen *nad1* thuộc hệ gen ty thể, hoặc gen *18S ribosome* so sánh với các chủng chuẩn quốc tế (Đài Loan, Trung Quốc, Thái Lan, Hàn Quốc, Úc, Mỹ...).

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Các mẫu sán lá gan nhỏ trưởng thành thu thập trên người Việt Nam ở Ninh Bình, Thanh Hoá, Nam Định, Bắc Giang, Hoà Bình, Hà Tây, Hà Nam, Quảng Ninh, Nghệ An, Đông Nai (người từ Nam Định vào) và ấu trùng của nó trên cá ở Nam Định, Hà Nội được xác định là *Clonorchis sinensis* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,1-99,6% và acid amin là 100%. Các mẫu sán lá gan nhỏ trưởng thành thu thập trên người Việt Nam ở Phú Yên, Bình Định, Quảng Nam, Thừa Thiên-Huế, Đắc Lắc được xác định là *Opisthorchis viverrini* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 100%.

3.2. Các mẫu sán lá gan lớn trưởng thành thu thập trên người Việt Nam ở Hà Tây, Nghệ An, TP. Hồ Chí Minh và ấu trùng nở từ trứng trong phân người là *Fasciola gigantica* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,5% và acid amin là 98,5% có phân hợp lai với *Fasciola hepatica*.

3.3. Các mẫu sán lá phổi trưởng thành thu thập từ chó nhiễm tự nhiên ở Hoà Bình, từ mèo gây nhiễm từ ấu trùng sán lá phổi ở Sơn La, Hoà Bình, Lào Cai, Yên Bái, sán lá phổi trưởng thành từ người ở Hoà Bình, miracidium nở từ

trùng sán lá phổi trong đờm bệnh nhân ở Yên Bái và ấu trùng sán lá phổi từ cua đá ở Sơn La, Hoà Bình, Lào Cai, Yên Bái, Hà Tĩnh được xác định là *Paragonimus heterotremus* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,0-99,7% và acid amin là 100%.

3.4. Các mẫu sán lá ruột lớn trưởng thành thu thập trên người ở Ninh Bình, Thanh Hoá, Thừa Thiên Huế, Cần Thơ và An Giang là *Fasciolopsis buski* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,99%.

3.5. Các đốt sán dây lợn thu thập được trên người từ Bắc Ninh và Thái Bình, các mẫu ấu trùng sán lợn trên người thu thập từ Bắc Giang, Bắc Kạn, Bắc Ninh, Hải Phòng, Tuyên Quang, Thái Nguyên, Lạng Sơn, Thái Bình và Hà Tây được xác định là *Taenia solium* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,1% và acid amin là 100%.

3.6. Các đốt sán dây thu thập được trên người ở Hà Tây, Bắc Ninh và Hoà Bình được xác định là *Taenia asiatica* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,5-99,7% và acid amin là 97,7-99,5%.

3.7. Các đốt sán dây thu thập được trên người Việt Nam ở Thanh Hoá, Kon Tum, Thái Nguyên, Hà Tĩnh, Phú Yên, Ninh Thuận, Đắk Lắk, TP.Hồ Chí Minh, Cần Thơ và Lâm Đồng được xác định là *Taenia saginata* với mức độ tương đồng với chủng quốc tế về nucleotid là 99,8-100% và acid amin là 99,1-100%.

3.8. Với trang thiết bị sẵn có và kiến thức cập nhật, Viện Sốt rét-KST-CT TU có khả năng tiếp tục nghiên cứu mở rộng về sinh học phân tử trong lĩnh vực Ký sinh trùng.

4. Kết luận

Các mẫu sán lá, sán dây và ấu trùng của chúng được thu thập từ 31 tỉnh ở cả 3 miền trong cả nước, trong đó có tỉnh thu thập nhiều loài sử dụng cho nghiên cứu này. Bằng phương pháp sinh học phân tử hệ gen ty thể (*cob*, *cox*, *nad1*) và 18S Ribosome so sánh với các chủng chuẩn quốc tế đã khẳng định loài sán dây Châu Á *Taenia asiatica* lưu hành ở Việt Nam, thẩm định loài *Taenia saginata*, *Taenia solium* trên người, ấu trùng sán dây lợn trên lợn và người Việt Nam là ấu trùng của *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*); loài sán lá phổi ở Việt Nam là *Paragonimus heterotremus*; loài sán lá gan lớn ở Việt Nam là *Fasciola gigantica* (có lai với *F. hepatica*); loài sán lá gan nhỏ ở miền Bắc Việt Nam là *Clonorchis sinensis*; loài sán lá gan nhỏ ở miền Nam là *Opisthorchis viverrini*; loài sán lá ruột lớn trên người Việt Nam được xác định là *Fasciolopsis buski*.

Phần B-NỘI DUNG BÁO CÁO CHI TIẾT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI

BƯỚC ĐẦU ỨNG DỤNG SINH HỌC PHÂN TỬ (KỸ THUẬT PCR) ĐỂ XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN LOÀI VÀ SỰ PHÂN BỐ SÁN LÁ, SÁN DÂY THƯỜNG GẶP Ở VIỆT NAM

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc chẩn đoán, giám định và phân loại nhiều loại sinh vật, trong đó có ký sinh trùng cho đến nay vẫn dựa vào hình thái học (kiểu hình) là chính. Các phương pháp sinh học phân tử (kiểu gen) đã bước đầu được ứng dụng trong chẩn đoán phân loại và lập phả hệ sinh vật. Các số liệu chính xác của các phương pháp sinh học phân tử đã cho phép ứng dụng những hướng mới và rất có thể sẽ làm thay đổi một phần hệ thống phân loại hiện có.

Phương pháp sinh học phân tử đang được ứng dụng ngày càng rộng rãi và có hiệu quả trong mọi lĩnh vực sinh học. Đó là việc sử dụng các kỹ thuật ADN (trước hết là kỹ thuật PCR) và kỹ thuật protein để xác định chuỗi gen hay chuỗi acid amin của từng gen, cũng như lập bản đồ gen của từng khu vực nhất định trong hệ gen của loài cần chẩn đoán để so sánh đối chiếu với những loài khác, nhằm xác định chính xác loài mong muốn. Hướng sử dụng hệ gen ty thể trong nghiên cứu quan hệ loài và phả hệ được coi là có cơ sở vững vàng nhất trong điều kiện hiện nay. Các gen của ty thể trong cùng chủng, cùng loài, thậm chí trong các loài có quan hệ gần về sinh học có sự bảo tồn rất cao, do vậy, bất cứ sự thay đổi nhỏ nào cũng là dấu hiệu giá trị trong giám định và phân loại.

Trong 10 năm gần đây và hiện nay, phương pháp sinh học phân tử dựa vào kỹ thuật PCR (polymerase chain reaction) sử dụng chỉ thị di truyền hệ gen nhân và hệ gen ty thể đang được ứng dụng rộng rãi và có độ tin cậy cao, đặc biệt được coi là rất có hiệu quả trong giám định và phân loại ký sinh trùng (Cupolillo và cs, 1994; Degrave và cs, 1994; Wilson, 1995; Aransay và cs, 2000; Reithinger và cs, 2000, De Andrade và cs, 2001 Salotra và cs, 2001).

Các loài ký sinh trùng đã lần lượt được giải mã gen và đăng ký vào Ngân hàng Gen thế giới (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) tạo cơ sở dữ liệu để có thể truy cập ứng dụng trong chẩn đoán, giám định và phân loại. Có trên 140 hệ gen ty thể đã được giải trình và phân tích hoàn toàn, trên 100 hệ gen ty thể khác đang từng phần được giải quyết, bao gồm tất cả mọi loài quan trọng từ bậc thấp đến bậc cao, từ động vật đơn bào đến động vật đa bào, cung cấp một hệ thống dữ liệu quan trọng cho các quá trình nghiên cứu gen, protein, tiến hoá, lịch sử tiến hoá, di truyền quần thể, quan hệ về loài, giống và nhiều lĩnh vực nghiên cứu quan trọng khác.

Từ trước đến nay, việc xác định thành phần loài giun sán ở Việt Nam là bằng hình thái học (Morphology). Vấn đề định loại bằng hình thái học đã đóng góp to lớn vào việc xác định thành phần loài ký sinh trùng, song vẫn còn những hạn chế nhất định và chính phân loại bằng sinh học phân tử sẽ khắc phục được những khiếm khuyết đó.

Chẳng hạn, trong quá trình nghiên cứu định loại có những ký sinh trùng khá giống nhau về hình thể như sán dây *Taenia saginata* và *Taenia asiatica*, thậm chí còn cho chúng là dưới loài của nhau. Ngay cả sán lá phổi cũng còn nhiều ý kiến về thành phần loài ở Việt Nam; sán lá gan nhỏ có 2 loài ở miền Bắc và miền Nam, vậy ranh giới địa lý giữa 2 loài là ở đâu? Hoặc trong số sán trưởng thành thu hồi từ bệnh nhân, bên cạnh những sán có cấu trúc hình thái điển hình, còn có một số không điển hình mà hình thái học rất khó xác định, đặc biệt là một số loài sán mới chưa được xác định ở Việt Nam. Hơn nữa đôi khi chỉ có mẫu trứng hoặc ấu trùng rất khó xác định chính xác loài. Do vậy, việc nghiên cứu sinh học phân tử đối với các loài giun sán nói riêng và ký sinh trùng nói chung là hết sức cần thiết ở nước ta hiện nay.

Từ năm 2001 đến nay đã có một số nghiên cứu về sinh học phân tử giám định thành phần loài sán ở Việt Nam bằng kỹ thuật PCR sử dụng chỉ thị di truyền hệ gen ty thể đã được một số tác giả thực hiện có hiệu quả.

Những kết quả bước đầu sử dụng phương pháp sinh học phân tử đã làm cơ sở khoa học cho việc áp dụng phương pháp này để xác định các loài sán lá, sán dây ở Việt Nam, đặc biệt là nghiên cứu sự phân bố của chúng và một số loài mới. Đề tài này được thực hiện nhằm mục tiêu:

- Bước đầu áp dụng kỹ thuật PCR để xác định thành phần loài và sự phân bố của một số loài sán lá, sán dây thường gặp ở Việt Nam.
- Nâng cao năng lực nghiên cứu sinh học phân tử của Viện Sốt rét-KST-CT TƯ

2. TỔNG QUAN

2.1. Tình hình nghiên cứu ngoài nước

Theo thông báo của Tổ chức Y tế thế giới, có trên 40 triệu người nhiễm sán lá truyền qua thức ăn và hơn 100 triệu người nhiễm sán dây/ấu trùng sán lợn, phân bố ở nhiều nước, đặc biệt ở các nước nhiệt đới.

Các tác giả Cupolillo và cs, 1994; Degrove và cs, 1994; Wilson, 1995, Degrove và cs, 1994; Aransay và cs, 2000; Reithinger và cs, 2000, De Andrade và cs, 2001 Salotra và cs, 2001 đã đi sâu nghiên cứu áp dụng sinh học phân tử sử dụng chỉ thị di truyền hệ gen nhân và hệ gen ty thể để xác định loài sinh vật, trong đó có ký sinh trùng.

Đối với phân biệt chẩn đoán sán lá gan lớn, đặc biệt là mẫu vật phân lập trên người, chỉ thị di truyền hệ gen ty thể đã góp phần giải quyết nhiều trường hợp của *F. hepatica* và *F. gigantica*: đó là khẳng định ở Nhật Bản chỉ tồn tại

loài *F. gigantica* (Hashimoto và cs, 1997); làm sáng tỏ quan hệ loài tam bội của *Fasciola* sp của Nhật Bản (Itagaki và cs, 1998); thu nhận bằng chứng lai tạo của 2 loài này trong tự nhiên ở Nhật Bản và Hàn Quốc (Agatsuma và cs, 2000). Nghiên cứu sinh học phân tử về sán lá gan lớn và ứng dụng trong chẩn đoán giám định cũng đã được các nhà khoa học nghiên cứu như: Agatsuma, T., Arakawa Y.,Iwagami M., Honzako Y., Cahyaningsih U., Kang S., Hong, S-J. 2000, Avise J.C., 1994, Bogitsh J.B, Cheng C.T., 1996, Hashimoto K., T. Watanobe, C.X. Liu, I. Init, D. Blair, S. Ohnishi and T. Agatsuma,1997, Itagaki,T.I., K. Tsutsumi, K. Ito and Y. Tsutsumi, 1998, Le, T.H., Blair, D. and McManus, D.P. 2001.

Bệnh sán lá gan nhỏ Clonorchiasis là bệnh được nghiên cứu một cách khá sâu ở Hàn Quốc bao gồm khảo sát huyết thanh học và kháng nguyên chẩn đoán (HONG và cs, 2001a; KIM và cs, 2001a), sinh học phân tử và tái tổ hợp protein phosphoglycerate kinaza (HONG và cs, 2000), và protein 28-kDa glutathione S-transferaza (KANG và cs, 2001; HONG và cs, 2001b). Hàn Quốc cũng là nước nghiên cứu kỹ các biện pháp phòng chống Clonorchiasis bằng praziquantel (HONG và cs, 1998), phương pháp chẩn đoán ELISA sử dụng cystatin (KIM và cs, 2001b), cũng như thực nghiệm gây nhiễm và khảo sát bệnh lý học bệnh clonorchiasis trên chuột (YOON và cs, 2001). Clonorchiasis và Opisthorchiasis là loại bệnh ký sinh trùng được chứng minh có liên quan chặt chẽ đến ung thư gan và mật tiền phát ở người (KIM, 1999; KIM và cs, 1999; PARK và cs, 2000). Do vậy việc chẩn đoán và xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh không những có ý nghĩa phòng trị bệnh ký sinh trùng mà còn giúp ngăn chặn tiến triển ung thư gan-mật ở người (KING và SCHOLZ, 2001). Sinh học phân tử về sán lá gan nhỏ được nghiên cứu và ứng dụng tại nhiều nước trong đó có Hàn Quốc (HONG và cs, 2000, 2001, KANG và cs, 2001) và Australia (Blair và cs, 1999, McManus và Bowles, 1996, Lê Thanh Hoà, 2001).

Các nhà khoa học trên thế giới đã lần lượt được giải mã gen từ động vật đơn bào đến động vật đa bào, trong đó có các loài ký sinh trùng và đăng ký vào Ngân hàng Gen thế giới, đây là cơ sở dữ liệu quan trọng để chúng ta so sánh trong quá trình giám định.

2.2. Tình hình nghiên cứu trong nước

Tại Việt Nam, bệnh sán lá, sán dây phổ biến hầu khắp trong cả nước như sán lá gan nhỏ (*Clonorchis* và *Opisthorchis*) lưu hành ở ít nhất 24 tỉnh với tỷ lệ nhiễm có nơi 37% như Nam Định, Phú Yên; 40% như Hà Tây (Nguyễn Văn Đề và cs, 2000, 2006); sán lá gan lớn (*Fasciola*) lưu hành ở ít nhất 43 tỉnh (Nguyễn Văn Đề và cs, 2004, 2006), có nơi tỷ lệ nhiễm 11,1% như Khánh Hoà (Nguyễn Văn Đề và cs, 2002); sán lá phổi (*Paragonimus*) lưu hành ở ít nhất 9 tỉnh, có nơi tỷ lệ nhiễm 15% như Sơn La (Nguyễn Văn Đề và cs, 1998, 2006); sán dây/ấu trùng sán lợn (*Taenia/Cysticercosis*) lưu hành ở ít

nhất 50 tỉnh, có nơi tỷ lệ nhiễm sán dây 12% và nhiễm ấu trùng sán lợn 5,7% như ở Bắc Ninh (Nguyễn Văn Đề và cs, 2004)...

Từ trước đến nay, việc xác định thành phần loài giun sán ở Việt Nam là bằng hình thái học (Morphology), song vẫn còn những hạn chế nhất định và chính phân loại bằng sinh học phân tử sẽ khắc phục được những khiếm khuyết đó và từ năm 2001 bắt đầu nghiên cứu xác định loài giun sán bằng sinh học phân tử. Trước hết, đó là nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR hệ gen ty thể xác định loài sán dây Châu Á *Taenia asiatica* đầu tiên ký sinh trên người ở Việt Nam (Nguyễn Văn Đề, Lê Thanh Hoà và CS, 2001); xác định loài ấu trùng sán lợn trên lợn Việt Nam là ấu trùng của *T. solium* (*C. cellulosa*); xác định loài sán lá phổi trên chó ở Lai Châu, Sơn La là *Paragonimus heterotremus* (Lê Thanh Hoà, Nguyễn Văn Đề và CS, 2001); xác định loài sán lá gan lớn *Fasciola gigantica* ở người tại Bình Định bằng gen Cox1 (Đặng Tất Thế, Lê Quang Hùng và cs, 2002) và bằng gen Nad2 (Lê Thanh Hoà, Nguyễn Văn Đề và CS, 2002): sử dụng gen *nad1*, gen *cox1* và phần giao gen ITS2 (internal transcribed spacer 2), khảo sát 15 chủng *Fasciola* sp của Việt Nam, một lần nữa khẳng định sự tồn tại của *Fasciola gigantica* ở nước ta; xác định loài sán lá gan nhỏ ở Thanh Hoá và Ninh Bình là *Clonorchis sinensis* (Lê Thanh Hoà, Nguyễn Văn Đề và CS, năm 2002); xác định loài sán lá ruột trên người tại Nghệ An là *Fasciolopsis buski* (Lê Thanh Hoà, Nguyễn Văn Đề, 2002).

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thiết kế nghiên cứu: mô tả phân tích

3.2. Thu thập mẫu theo phương pháp có chủ đích

Các mẫu thu hồi được phân định bằng hình thái học và chia làm 2 nhóm:

- Nhóm có hình thái học điển hình, chọn mẫu làm PCR
- Nhóm có hình thái học không điển hình, chọn mẫu làm PCR

Trong nghiên cứu này quy định vĩ tuyến 17 là ranh giới miền Bắc và miền Nam.

3.2.1. Thu thập mẫu trên người: sán lá gan, sán lá ruột và sán dây từ bệnh nhân bằng đũa phân khi điều trị; mẫu sán lá phổi từ đờm bệnh nhân khi điều trị; mẫu ấu trùng sán lợn bằng sinh thiết các nang sán dưới da. Các mẫu thu thập được xác định thành phần loài bằng hình thái học và chọn mẫu cần xác định bằng PCR như sau:

Số lượng mẫu: sán lá gan nhỏ (8 mẫu tại 8 tỉnh miền Bắc: Nam Định, Ninh Bình, Hà Tây, Thanh Hoá, Hà Nam, Hoà Bình, Quảng Ninh và Nghệ An; 5 mẫu tại 4 tỉnh miền Nam và Tây Nguyên: Thừa Thiên- Huế, Quảng Nam, Phú Yên, Bình Định và Đắc Lắc). Mẫu sán lá phổi (5 mẫu ở 5 tỉnh miền Bắc: Lai Châu, Sơn La, Lào Cai, Hoà Bình, Yên Bái). Mẫu sán lá ruột lớn (3 mẫu ở 3 tỉnh miền Bắc: Nam Định, Ninh Bình và Nghệ An, 3 mẫu tại miền Nam: