

XÁC ĐỊNH LOÀI SÁN LÁ GAN LỚN GÂY BỆNH Ở BÒ VÀ Ở NGƯỜI KHU VỰC MIỀN BẮC (VIỆT NAM) BẰNG HÌNH THÁI HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ

Đỗ Ngọc Ánh*; Nguyễn Khắc Lực*

TÓM TẮT

Phân loại 43 mẫu sán lá gan lớn (SLGL) ở bò và 01 mẫu ở người tại 5 tỉnh miền Bắc (Việt Nam) theo các chỉ số dài/rộng và khoảng cách từ giác bụng đến cuối thân. 25 mẫu SLGL bò và mẫu SLGL người được thực hiện phản ứng PCR để nhân đoạn gen chứa gen *cox1*. 7 mẫu trong số này (trong đó có mẫu SLGL người) được chọn ngẫu nhiên đem giải trình tự để xác định loài. Kết quả phân loại theo chỉ số dài/rộng: 81,4% phù hợp với *F. hepatica*, 18,6% phù hợp với *Fasciola sp.* Theo chỉ số khoảng cách từ giác bụng đến cuối thân (VS-P): 93,02% phù hợp với *F. hepatica*, 6,98% phù hợp với *Fasciola sp.* So sánh trình tự gen *cox1* của SLGL với trình tự chuẩn trên ngân hàng gen cho thấy 7 mẫu được giải trình tự đều là *Fasciola gigantica*. SLGL có tính đa hình về hình thái. Do vậy, nên sử dụng phương pháp sinh học phân tử để xác định loài SLGL.

* Từ khóa: Sán lá gan lớn; Hình thái học; Sinh học phân tử; Miền Bắc Việt Nam.

IDENTIFICATION OF *FASCIOLA SPP* IN CATTLE AND HUMAN PATHOGENS COLLECTED FROM NORTH REGION USING MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

SUMMARY

43 samples of *Fasciola sp.* in cattle and 01 sample of *Fasciola sp.* in human from 5 provinces were classified by distance between ventral sucker and posterior end of the body (VS-P) and ratio between body length and body width (BL/BW). 25 out of 43 samples of *Fasciola sp.* in cattle and 01 sample of *Fasciola sp.* in human were performed polymerase chain reaction to amplify a portion of mitochondrial *cox1*. 7 of these samples were chosen randomly to direct sequencing. The result showed that: according to the BL/BW, 84.4% were morphologically identified as *F. hepatica*, 18.6% as intermediate forms; according to the VS-P, 93.02% were morphologically identified as *F. hepatica*, 18.6% as intermediate forms. Comparing *cox1* sequences with the BLAST GenBank database, confirmed that all 7 samples were *F. gigantica*. *Fasciola sp.* have polymorphic forms. Thus, we should use molecular method to determine the species of *Fasciola sp.*

* Key words: *Fasciola spp*; Morphological; Molecular; North region of Vietnam.

* Học viện Quân y

Chịu trách nhiệm nội dung khoa học: GS. TS. Lê Bách Quang

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh SLGL do *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) và *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1885) gây ra, rất phổ biến ở động vật nhai lại như cừu, dê, trâu, bò... trên khắp thế giới [4]. Người có thể bị bệnh khi ăn rau sống hoặc uống nước lã có nang ấu trùng của SLGL còn sống. Tại một số khu vực trên thế giới, tỷ lệ nhiễm SLGL ở người rất cao và nhiễm SLGL được xem là vấn đề sức khỏe được cộng đồng quan tâm [5].

Ở nước ta, từ năm 1999, tình hình bệnh do SLGL ở người ngày càng có xu hướng tăng dần. Tính đến năm 2006, số ca mắc bệnh SLGL ở người được xác định là 2.428, nhưng chỉ sau 2 năm đã tăng > 5.000 ca. Theo Đặng Thị Cẩm Thạch (2008) [5], bệnh do SLGL ở người phân bố ở 47 tỉnh/thành từ Bắc vào Nam [5]. Theo Nguyễn Văn Đề và CS (2012), bệnh SLGL đã phân bố ở 52 tỉnh/thành phố và tại một số điểm, loài SLGL được xác định là *F. gigantica* [1, 3].

Những năm gần đây, do nhu cầu đời sống ngày càng cao, việc nhập ngoại các giống gia súc để cải thiện chất lượng đàn giống nhằm tăng sản lượng thịt đàn gia súc có thể làm du nhập loài SLGL mới vào Việt Nam. Sự xuất hiện loài mới có thể làm thay đổi tính chất dịch tễ bệnh ở động vật và ở người. Do vậy, việc xác định loài SLGL là rất cần thiết, từ đó có cơ sở lựa chọn, thực hiện những nghiên cứu tiếp theo nhằm tìm hiểu cơ chế bệnh sinh, nghiên cứu tạo ra các kit huyết thanh chẩn đoán, nghiên cứu thuốc điều trị, tình hình kháng thuốc... qua đó góp phần quan trọng trong công tác phòng chống bệnh do SLGL gây ra ở động vật và ở người, phù hợp với điều kiện của từng quốc gia, vùng lãnh thổ. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm: *Xác định loài SLGL thu thập ở 5 tỉnh miền Bắc dựa*

vào một số chỉ số hình thái và bằng chỉ thị gen ty thể cox1.

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**1. Đối tượng nghiên cứu.**

1 mẫu (Hà Nội) SLGL thu thập ở người, 43 mẫu ở bò tại Vĩnh Phúc (13 mẫu), Hà Nội (10 mẫu), Bắc Giang (7 mẫu), Điện Biên (6 mẫu), Nghệ An (7 mẫu).

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Ký sinh trùng và Labo Công nghệ Gen và Di truyền tế bào, Học viện Quân y, từ 12 - 2010 đến 9 - 2012.

2. Vật liệu nghiên cứu.

- Lam kính, thước đo milimet, dao phẫu tích gan, lọ chứa bệnh phẩm (hãng Nam Khoa), cồn 70°, cồn 90°, cồn 96°, dung dịch cồn axít...

- Bộ kit tách ADN tổng số QIAamp DNA extraction kit và hóa chất cần thiết (hãng QIAGEN Inc, Mỹ).

- Sử dụng cặp mồi Ita 8 (5'-ACGTTGGA TCATAAGCGTGT-3') và Ita 9 (5'-CCTCAT CCAACATAACCTCT-3' để nhân đoạn ADN chứa gen *cox1* (Itagaki và CS, 2005).

- Bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (Promega).

- Máy đo nồng độ ADN, máy PCR GeneAmp PCR system 9700 AB (Applied Biosystem, Mỹ), máy soi và chụp gel Dolphin Doc (Wealtec, Mỹ), bộ điện di kiểm tra sản phẩm PCR (hãng Bio-Rad), máy xác định trình tự ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer.

3. Phương pháp nghiên cứu.

* *Phương pháp xác định loài bằng hình thái học:*

- Xác định kích thước các chỉ số để phân loại SLGL: 43 mẫu SLGL động vật và 1 mẫu ở người được làm tiêu bản và đo các chỉ số: chiều dài (D), chiều rộng (R), khoảng

cách giác bụng đến cuối thân (VS-P). Các chỉ số hình thái được tính theo đơn vị milimet.

- Phân nhóm loài sán theo một số chỉ số hình thái: theo Periago và CS (2006) [9], căn cứ tỷ lệ dài/rộng (D/R) và khoảng cách giác bụng đến cuối thân (VS-P), có thể chia SLGL làm 3 nhóm. Cụ thể: theo D/R, *F. hepatica*-like từ 1,65 - 2,76 và *F. gigantica*-like từ 3,43 - 5,50; theo VS-P, *F. hepatica*-like từ 12,40 - 25,08 mm và *F. gigantica*-like từ 31,01 - 45,39 mm. Chỉ số có giá trị nằm giữa được xếp vào nhóm trung gian.

* *Xác định loài theo phương pháp sinh học phân tử:*

Mỗi tỉnh chọn 5 mẫu SLGL để tách ADN và thực hiện phản ứng PCR. Tiếp theo, 7 mẫu thuộc 5 tỉnh được chọn ngẫu nhiên để giải trình tự. Các bước tiến hành được tóm tắt như sau: lấy một phần cơ thể sán (phần đuôi) cho vào cối chuyên dụng và nghiền nhỏ trong nitor lỏng. Sau đó, sử dụng bộ sinh phẩm *QIAamp DNA extraction kit* (hãng QUIAGEN Inc, Đức) để tách ADN tổng số. AND tổng số được lấy làm khuôn

cho phản ứng PCR để khuếch đại đoạn ADN chứa gen *cox1*. Các thành phần phản ứng PCR gồm: PCR master mix (Promega), cặp mồi Ita 8 và Ita 9, ADN khuôn (template) và nước tinh khiết. Các bước phản ứng PCR: 1 chu kỳ 94°C trong 5 phút, 30 chu kỳ 94°C trong 90 giây, 55°C trong 90 giây, 72°C trong 120 giây, cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% ở dòng điện 100V trong thời gian 30 phút và được chụp ghi lại hình ảnh trên máy Dolphin Doc. Sản phẩm PCR tiếp tục được tinh sạch và giải trình tự trực tiếp bằng máy ABI 3130xl Gentic Analyzer.

* *Xử lý số liệu:*

Xử lý số liệu về kích thước bằng phần mềm thống kê SPSS 13.0 for windows. So sánh trình tự gen *cox1* trên <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> và xác định phả hệ bằng phần mềm Clustal X và BioEdit.

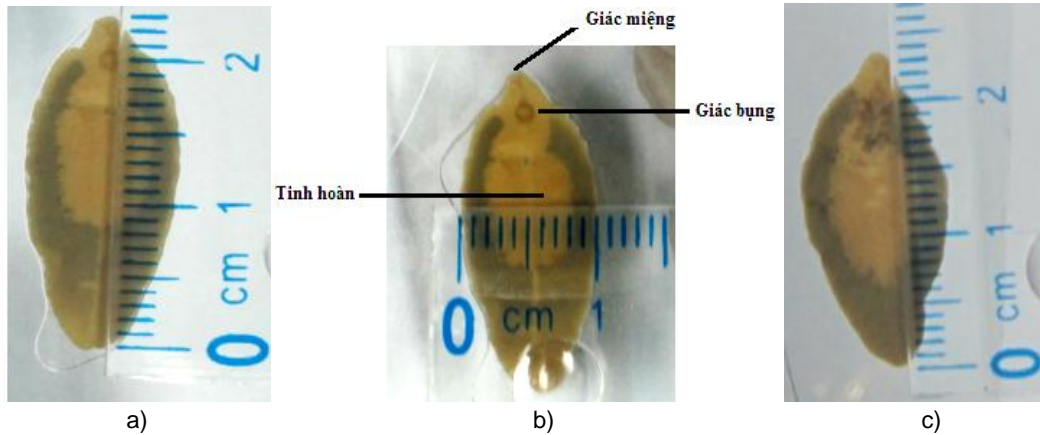
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Kết quả xác định kích thước và phân loại SLGL theo hình thái.

Bảng 1: Kích thước một số chỉ số hình thái của SLGL bò và người.

CHỈ SỐ	SLGL BÒ				SLGL NGƯỜI	
	n	Min	Max	X ± SD	n	Giá trị
Chiều dài (D)	43	23,10	35,00	27,28 ± 3,13	1	30,5
Chiều rộng (R)	43	9,00	12,50	10,65 ± 0,62	1	9,50
Tỷ lệ D/R	43	1,96	3,33	2,57 ± 0,31	1	3,21
VS-P	43	17,00	31,00	23,33 ± 3,08	1	26,50

Chiều dài của SLGL bò dao động từ 23,1 - 35,0 mm (trung bình 27,28 ± 3,13 mm), chiều rộng từ 9,0 - 12,50 mm (trung bình 10,65 ± 0,62 mm). Tỷ lệ D/R của SLGL dao động từ 1,96 - 3,33 mm (trung bình 2,57 ± 0,31 mm). VS-P dao động từ 17,0 - 31,00 mm (trung bình là 23,33 ± 3,08 mm). Chiều dài của mẫu SLGL người 30,5 mm, chiều rộng 9,50 mm, tỷ lệ D/R: 3,21, VS-P: 26,5 mm.



Hình 1: Một số mẫu sán thu từ Điện Biên
(a và b: Mẫu SLGL Điện Biên 2, c: mẫu SLGL Điện Biên 3).

Bảng 2: Phân nhóm SLGL theo chỉ số D/R và VS-P.

LOÀI SÁN	THEO D/R		THEO VS-P	
	n	%	n	%
<i>F. hepatica</i> -like	35	81,40	40	93,02
<i>Fasciola sp.</i> -like	8	18,60	3	6,98
<i>F. gigantica</i> -like	0	0	0	0

Đối với SLGL bò, theo tỷ lệ D/R, 35 mẫu (81,4%) phù hợp với *F. hepatica*, 8 mẫu (18,6%) phù hợp với *Fasciola sp.* Theo VS-P, 40 mẫu (93,02%) phù hợp với *F. hepatica* và 3 mẫu (6,98%) phù hợp với *Fasciola sp.* Không mẫu nào có tỷ lệ D/R và VS-P phù hợp với *F. gigantica*. Mẫu SLGL người thuộc nhóm trung gian.

2. Kết quả nhân đoạn gen *Cox1* bằng kỹ thuật PCR.

* Kết quả nhân gen các mẫu SLGL:



Hình 2: Kết quả nhân gen mẫu SLGL thu thập ở người (NA1: mẫu Nghệ An 1, VP1: mẫu Vĩnh Phúc 1, DB1: mẫu Điện Biên 1, HN1: mẫu Hà Nội 1, BG1: mẫu Bắc Giang 1, SLGN: SLGL từ người, M: Marker 100 bp).

Sản phẩm PCR của mẫu SLGL thu thập từ người có kích thước khoảng 450 bp, ngang bằng với các mẫu SLGL NA1, VP1, ĐB1, HN1 và BG1.

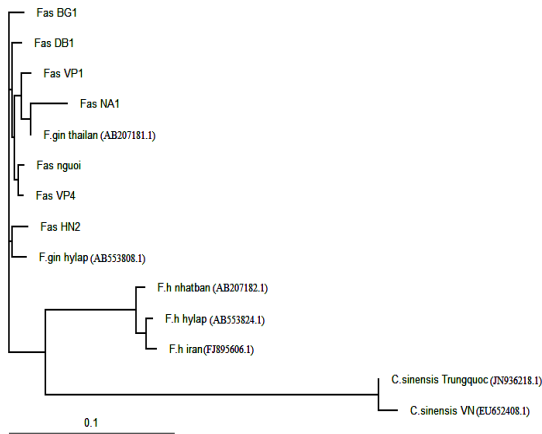
Bảng 3: Các vị trí sai khác của SLGL nghiên cứu với *F. gigantea* chủng Thái Lan (AB207181.1).

Kí HIỆU	NƠI PHÂN LẬP	VỊ TRÍ TRONG TRỐNH TỰ CỦA CHUỖI GEN <i>cox1</i>						
		41	66	245	302	332	341	413
<i>F.g_TL</i>	Thái Lan	G	G	G	G	T	T	G
<i>Fas.BG1</i>	Bắc Giang	G	A	G	G	T	T	G
<i>Fas.ĐB1</i>	Điện Biên	G	A	G	G	C	C	G
<i>Fas.HN2</i>	Hà Nội	G	A	G	A	T	C	T
<i>Fas.NA1</i>	Nghệ An	G	A	A	G	T	C	T
<i>Fas.VP4</i>	Vĩnh Phúc	T	A	G	G	T	C	T
<i>Fas.Nguoi</i>	Người	T	A	R	G	T	C	T

Bảng 4: Sự sai khác và mức độ tương đồng về nucleotid của các mẫu SLGL nghiên cứu với *F. gigantea* Thái Lan (AB207181.1).

KÍ HIỆU	NƠI PHÂN LẬP	SỐ Nu SAI KHÁC	% TƯƠNG ĐỒNG
<i>F.g_TL</i>	Thái Lan	0	100%
<i>Fas.BG1</i>	Bắc Giang	2	99,54%
<i>Fas.ĐB1</i>	Điện Biên	3	99,32%
<i>Fas.HN2</i>	Hà Nội	4	99,09%
<i>Fas.NA1</i>	Nghệ An	4	99,09%
<i>Fas.VP1</i>	Vĩnh Phúc	5	98,86%
<i>Fas.VP4</i>	Vĩnh Phúc	4	99,09%
<i>Fas.Nguoi</i>	Người	5	98,86%

Trình tự chuỗi nucleotid gen *cox1* của các mẫu SLGL trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng cao so với *F. gigantea* chủng Thái Lan (AB207181.1). Số nucleotid sai khác không quá 5 (nu) và mức độ tương đồng đạt 98,86 - 99,54%.



Hình 3: Quan hệ phả hệ của SLGL trong nghiên cứu với SLGL ở một số nước trong khu vực và trên thế giới.

Kết quả phân tích mối quan hệ phả hệ của một số mẫu SLGL trong nghiên cứu này so với SLGL *F. gigantica* (Thái Lan, Hy Lạp) và *F. hepatica* (Nhật Bản, Hy Lạp, Iran) cho thấy, các mẫu SLGL trong nghiên cứu này có quan hệ gần gũi với SLGL *F. gigantica* (Thái Lan, Hy Lạp) và quan hệ xa hơn với *F. hepatica* (Nhật Bản, Hy Lạp, Iran) và xa hơn nữa với sán lá gan bé (SLGB) *C. sinensis* (Trung Quốc, Việt Nam).

BÀN LUẬN

1. Về đặc điểm hình thái của SLGL tại một số tỉnh miền Bắc.

Hình thể của *F. hepatica* và *F. gigantica* được mô tả từ lâu với nhiều điểm giống và khác nhau. Trước đây, phân biệt 2 loài *F. hepatica* và *F. gigantica* chủ yếu dựa vào đặc điểm: kích thước của *F. gigantica* dài hơn, phần nhô lên của vai và phần đầu hình nón ngắn hơn, buồng trứng chia nhiều nhánh hơn, kích thước giác bụng lớn hơn giác miệng... [4]. Tuy nhiên, nhiều tác giả cho rằng, các chỉ số trên có khoảng gối lên nhau, do vậy, trong nhiều trường hợp, khó phân biệt *F. hepatica* và *F. gigantica*. Gần đây, một số nghiên cứu cho rằng, các chỉ số BR (chu vi cơ thể), tỷ số D/R, VS-P có

sự khác biệt rõ ràng, ít có khoảng gối lên nhau, nên là các chỉ số hình thái rất có giá trị trong việc phân biệt *F. hepatica* và *F. gigantica* [9]. Trong nghiên cứu này, hầu hết các mẫu SLGL có dạng thon, dài, một số có kích thước và hình dạng rất giống với hình thái của *F. hepatica*.

Từ kết quả đo đạc, 2 chỉ số D/R và VS-P được dùng để phân loại SLGL. Theo Periago và CS (2006) [9], chỉ số VS-P ở *F. hepatica* là 12,40 - 25,08 mm (trung bình $20,79 \pm 0,31$ mm), *F. gigantica* là 31,01 - 45,39 mm (trung bình $41,02 \pm 1,21$ mm); tỷ lệ D/R ở *F. hepatica* là 1,65 - 2,76 mm (trung bình $2,27 \pm 0,03$ mm), *F. gigantica* là 3,43 - 5,50 mm (trung bình $4,37 \pm 0,17$ mm). Xếp loại SLGL theo Periago và CS (2006) [9] cho thấy, hầu hết các mẫu SLGL bò được xếp vào nhóm *F. hepatica-like* (81,40% theo chỉ số D/R và 93,02% theo VS-P), một số ít xếp vào nhóm *Fasciola sp.-like* (dạng trung gian) và không có mẫu sán nào xếp vào nhóm *F. gigantica-like* (bảng 2). Mẫu SLGL người thuộc nhóm *Fasciola sp.-like* (bảng 1).

Trước đây, nhiều tác giả cho rằng, ở Việt Nam có cả 2 loài *F. hepatica* và *F. gigantica*. Tuy nhiên, gần đây Nguyễn Thế Hùng và CS (2008) [3] giám định phân tử cho thấy, SLGL ở Hà Nội là loài *F. gigantica* [3]. Tại Nghệ An và Cao Bằng, theo Nguyễn Quốc Doanh và CS (2006) [1], SLGL cũng là loài *F. gigantica*. Như vậy, kết quả phân loại hình thái ở nghiên cứu này và phân loại phân tử trong một số nghiên cứu trước không phù hợp. Câu hỏi đặt ra là: phân loại hình thái đã chính xác chưa hay có sự xuất hiện loài SLGL?... Về vấn đề này, nhiều tác giả cho rằng, dựa vào hình thái, khó có thể xác định chính xác loài, nhất là các loài có họ hàng gần gũi, do các loài này có tính đa hình về hình thái [6, 7]. Kích thước và hình dạng của SLGL phụ thuộc vào vật chủ ký

sinh, số lượng sản nhiễm và tình trạng dinh dưỡng của vật chủ, thời gian thu thập mẫu... Nghiên cứu của Ghavami và CS (2009) [7] là dẫn chứng cho nhận định này. Theo đó, trong số 584 cá thể SLGL thu thập từ bò và cừu, 31% số cá thể SLGL có hình thái giống *F. hepatica*-like, 7% giống *F. gigantica*-like và 62% giống *Fasciola sp.*-like. Tuy nhiên, kết quả giám định phân tử một số mẫu được chọn ngẫu nhiên từ cả 3 nhóm trên cho kết quả là *F. hepatica*. Chính vì những hạn chế của phương pháp hình thái, một số mẫu sán đã được chúng tôi giám định lại bằng sinh học phân tử.

2. Về kết quả xác định loài bằng sinh học phân tử.

Để xác định chính xác về loài, ADN của từng mẫu sán thu nhận tại 5 địa phương được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Cặp mồi sử dụng là *Ita 8* và *Ita 9*. Theo T Itagaki và CS (2005) [8], cặp mồi này có khả năng nhân đặc hiệu đoạn gen chứa vùng *cox1* có kích thước 438 bp của hệ gen ty thể SLGL. Kết quả nhân gen ở hình 2 cho thấy, các mẫu SLGL động vật và mẫu SLGL người PCR đều cho band có kích thước bằng nhau (khoảng 450 bp), phù hợp với kích thước đoạn ADN được T Itagaki và CS (2005) [8] công bố.

Tuy nhiên, vì cặp mồi *Ita8* và *Ita9* không đặc trưng cho loài, nên kết quả PCR không đủ cơ sở để phân biệt SLGL là *F. hepatica* hay *F. gigantica*. Vì vậy, ở mỗi tỉnh chúng tôi đã lựa chọn ngẫu nhiên 1 - 2 mẫu/5 mẫu thực hiện PCR để giải trình tự. So sánh với trình tự chuỗi ADN ty thể thu được với ngân hàng gen cho thấy, trình tự của cả 7 mẫu có mức tương đồng đạt > 98,86% so với trình tự chuẩn của *F. gigantica* Thái Lan (AB207181.1). Như vậy, tất cả 7 mẫu SLGL đem giải trình tự (Fas.BG1, Fas.ĐB1,

Fas.HN2, Fas.NA1, Fas.VP1, Fas.VP4, Fas.Người) đều là *F. gigantica*.

Mặt khác, kết quả phân tích phá hệ (hình 3) cho thấy các mẫu SLGL trong nghiên cứu này có quan hệ gần gũi với các mẫu SLGL *F. gigantica* Thái Lan (AB207181.1) và *F. gigantica* Hy Lạp (AB553808.1); có quan hệ xa hơn với các mẫu *F. hepatica* Nhật Bản (AB207182.1), Hy Lạp (AB553824.1) và Iran (FJ895606/1); có quan hệ xa hơn nữa với SLGN *C. sinensis* Trung Quốc (JN936218.1) và Việt Nam (EU652408.1). Từ kết quả so sánh tỷ lệ tương đồng nucleotid và phân tích phá hệ cho phép kết luận 7 chủng SLGL được nghiên cứu đều là loài *F. gigantica*.

Như vậy, phân loại hình thái và phân tử của SLGL trong nghiên cứu này không đồng nhất. Điều đó cho thấy SLGL có tính đa dạng về hình thái và chỉ dựa vào hình thái không đủ cơ sở để kết luận SLGL thuộc loài nào. Vì vậy, muốn xác định loài SLGL, cần dựa vào kỹ thuật sinh học phân tử.

KẾT LUẬN

SLGL đa hình có tính đa dạng về hình thái, hầu hết các mẫu SLGL ở động vật được xếp vào nhóm *F. hepatica*-like (81,40% theo chỉ số BL/BW và 93,02% theo VS-P).

Kết quả giám định loài bằng chỉ thị gen *cox1* không tương ứng với kết quả phân tích hình thái. Các mẫu SLGL ở bò và ở người được giám định bằng giải trình tự cho kết quả là loài *Fasciola gigantica*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Quốc Doanh, Lê Thanh Hòa. Một số đặc điểm hình thái và phân tử của sán lá gan (*Fasciola sp.*) ở bò của tỉnh Nghệ An và Cao Bằng. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 2006, 13 (5), tr.59-67.

2. Nguyễn Văn Đề, Phan Thị Hương Liên, Phạm Ngọc Minh, Đỗ Tuấn Anh. Tỷ lệ nhiễm SLGL trên nhóm bệnh nhân được chẩn đoán “u gan” tại bệnh viện Hà Nội năm 2010 - 2011. Kỷ yếu Hội nghị khoa học quốc tế Mékong Santé III. 2012, tr.22-29.
3. Nguyễn Thế Hùng, Lê Thanh Hòa, Giang Hoàng Hà. Kết quả định loại SLGL thu thập ở lò mổ Hà Nội bằng phương pháp PCR. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 2008, 15 (3), tr.50-55.
4. Lê Bách Quang và CS. Ký sinh trùng và côn trùng y học (Giáo trình giảng dạy đại học). Nhà xuất bản Quân đội nhân dân. 2008, tr.233-236.
5. Đặng Thị Cẩm Thạch, Đỗ Trung Dũng, Lê Ngọc Loan. Tình hình nhiễm SLGL ở Việt Nam năm 2007 và đề xuất biện pháp phòng chống. Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng. 2008, 4, tr.1-37.
6. Nguyễn Thị Giang Thanh, Triệu Nguyên Trung, Lê Thanh Hòa. Nghiên cứu thẩm định loài SLGL (*Fasciola spp.*) gây bệnh trên dê tại Việt Nam bằng chỉ thị phân tử. 2010. Nguồn <http://www.impe-qn.org.vn/impe-qn/vn/portal>.
7. Ghavami MB, Rahimi P, Haniloo A, Mosavinasab SN. Genotypic and phenotypic analysis of *Fasciola* isolates. Iranian J Parasitol. 2009, 4 (3), pp.61-70.
8. Itagaki T et al. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola sp.* in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology. 2005, 131, pp.1-7.
9. Periago MV, Valero MA, Panova M, Mas-Coma S. Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). Parasitol Res. 2006, 99, pp.368-378.
10. Periago MV et al. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. Infection. Genetics and Evolution. 2008, 8, pp.51-58.

Ngày nhận bài: 30/10/2012

Ngày giao phản biện: 10/11/2012

Ngày giao bản thảo in: 6/12/2012

