

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

HỒ VĂN THĂNG

MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM NHIỄM NẤM, ĐỘC TỔ NẤM
TRÊN THUỐC CỔ TRUYỀN VÀ KẾT QUẢ CAN THIỆP
TẠI BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN
TỈNH NGHỆ AN (2023 - 2025)

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Chuyên ngành: Dịch tễ học

Mã số: 972 01 17

Hà Nội, 2026

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

HỒ VĂN THĂNG

**MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM NHIỄM NẤM, ĐỘC TỔ NẤM
TRÊN THUỐC CỔ TRUYỀN VÀ KẾT QUẢ CAN THIỆP
TẠI BỆNH VIỆN Y HỌC CỔ TRUYỀN
TỈNH NGHỆ AN (2023 - 2025)**

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Chuyên ngành: Dịch tễ học

Mã số: 972 01 17

Cán bộ hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Cao Bá Lợi

PGS. TS. Dương Đình Chính

Hà Nội, 2026

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới PGS. TS. Cao Bá Lợi, PGS. TS. Dương Đình Chính, đã tận tình chỉ dẫn giúp đỡ tôi hoàn thành luận án này. Tôi xin trân trọng cảm ơn!

PGS.TS. Hoàng Đình Cảnh Viện trưởng và Ban Giám đốc Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, cùng toàn thể cán bộ Phòng Khoa học và Đào tạo Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương đã tận tình giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập và thực hiện đề tài nghiên cứu.

PGS. TS. Lê Xuân Hùng, PGS.TS. Nguyễn Mạnh Hùng, PGS.TS. Lê Trần Anh, PGS.TS. Đinh Hồng Dương, TS. Trần Quang Phục, TS. Vũ Thị Lâm Bình đã có những ý kiến quý báu giúp tôi hoàn thiện luận án. Sở Y tế, Sở Khoa học và Công nghệ. Ban Giám đốc, cùng toàn thể cán bộ Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Bố, Mẹ, Vợ, Con, gia đình và bạn bè đồng nghiệp đã động viên khích lệ tôi vượt qua mọi khó khăn gian khổ hoàn thành luận án. Luận án chỉ là bước đầu trong sự nghiệp khoa học. Những lời cảm ơn là không đủ vì làm sao kể hết những tình cảm thật cao quý, nhưng những tình cảm đó sẽ theo tôi trong suốt cuộc đời không bao giờ thay đổi!

Nghiên cứu sinh



Hồ Văn Thắng

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trên bất kỳ công trình nào khác. Chấp hành *ng nghiêm* chỉnh các quy định về y đức trong nghiên cứu y sinh học. Nếu sai tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Tác giả luận án

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Hồ Văn Thắng

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
AF	Aflatoxin	
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người
BYT		Bộ Y tế
CDC	Centers for Disease Control and Prevention	Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa kỳ
FAO	Food and Agriculture Organization	Tổ chức Nông Lương thế giới
FB1	Fumonisin B1	
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Vi rút gây suy giảm miễn dịch ở người
HRP	Horseradish Peroxidase	Chất cộng hợp
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi Polymerase
PV	Preventive Value	Hiệu quả can thiệp
QCVN		Quy chuẩn Việt Nam
RELP	Restriction Fragment Length Polymorphism	Kỹ thuật đa hình chiều dài cắt đoạn
TLM		Tỷ lệ mắc
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
XN	XN	Xét nghiệm
YTLQ	YTLQ	Yếu tố liên quan
YTNC	YTNC	Yếu tố nguy cơ

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Một số khái niệm và thuật ngữ sử dụng trong nghiên.....	3
1.1.1. Khái niệm về nấm	3
1.1.2. Nấm y học	3
1.1.3. Nấm mốc	4
1.1.4. Lịch sử nghiên cứu nấm và độc tố nấm trên thế giới.....	5
1.1.5. Lịch sử nghiên cứu nấm và độc tố nấm tại Việt Nam.....	6
1.2. Đặc điểm dịch tễ nhiễm nấm.....	8
1.2.1 Tác nhân nấm	8
1.2.2. Đường lan truyền của nấm	10
1.2.3. Khởi cảm thụ	11
1.2.4. Các yếu tố liên quan đến nhiễm nấm	11
1.2.5. Tình hình nhiễm nấm và aflatoxin ở thực phẩm, thuốc cổ truyền và các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch	16
1.2.6. Cấu trúc phân tử, cơ chế sinh aflatoxin và gây độc của aflatoxin.....	20
1.3. Các kỹ thuật xác định nhiễm nấm và aflatoxin	24
1.3.1. Kỹ thuật xác định nhiễm nấm	24
1.3.2. Một số bệnh ở người do nấm và độc tố nấm.....	27
1.3.3. Các kỹ thuật xác định nhiễm aflatoxin.....	28
1.4. Phòng nhiễm nấm và aflatoxin trong thuốc cổ truyền	31
1.4.1. Các biện pháp về pháp lý	31
1.4.2. Các biện pháp kỹ thuật.....	32
1.4.3. Tình hình nghiên cứu về nấm và tác hại của nấm với thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An.....	34
Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.1. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1: <i>Xác định tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trong một số vị thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023</i>	35
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	35
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu	35
2.1.3. Thời gian nghiên cứu	35
2.1.4. Thết kế nghiên cứu	35
2.1.5. Cỡ mẫu, phương pháp chọn mẫu nghiên cứu	36
2.1.6. Nội dung nghiên cứu	37

2.1.7. Các biến số trong nghiên cứu	37
2.1.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	38
2.1.9. Các chỉ số nghiên cứu	43
2.2. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2: <i>Phân tích tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các độc tố aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An, năm 2023</i>	44
2.2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	44
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	44
2.2.3. Thời gian nghiên cứu	44
2.2.4. Thiết kế nghiên cứu.....	44
2.2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu	44
2.2.6. Nội dung nghiên cứu	44
2.2.7. Các biến số trong nghiên cứu.....	45
Các biến số mục tiêu 2 như bảng 2.2 sau:.....	45
2.2.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	45
2.2.9. Các chỉ số nghiên cứu	50
2.3. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3: <i>Đánh giá kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền</i>	50
2.3.1. Đối tượng nghiên cứu.....	50
2.3.2. Địa điểm nghiên cứu	50
2.3.3. Thời gian nghiên cứu	51
2.3.4. Thết kế nghiên cứu.....	51
2.3.5. Cỡ mẫu, phương pháp chọn mẫu nghiên cứu	51
2.3.6. Nội dung nghiên cứu	52
2.3.7. Các biến số trong nghiên cứu.....	55
2.3.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	56
2.3.9. Các chỉ số nghiên cứu	56
2.4. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu	57
2.5. Sai số và hạn chế sai số	57
2.6. Đạo đức nghiên cứu	57
2.7. Mô hình thiết kế nghiên cứu	58
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	59
3.1. Tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023.....	59
3.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền	59
3.1.2. Kết quả xác định thành phần loài nấm.....	61

3.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các aflatoxin B ₁ , aflatoxin B ₂ , aflatoxin G ₁ , aflatoxin G ₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An	73
3.2.1. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin	73
3.2.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền.....	77
3.2.3. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin.....	79
3.2.4. Độ thu hồi aflatoxin trong các mẫu xét nghiệm phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.....	81
3.2.5. Tỷ lệ các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT.....	87
3.3. Kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu bảo quản thuốc cổ truyền.....	88
3.3.1. Trang thiết bị bảo quản thuốc và điều kiện vi khí hậu kho thuốc trước và sau can thiệp	88
3.3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm trước và sau can thiệp	92
Chương 4: BÀN LUẬN	94
4.1. Tỷ lệ, thành phần loài nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023	94
4.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền	94
4.1.2. Thành phần loài nấm.....	100
4.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ aflatoxin B ₁ , aflatoxin B ₂ , aflatoxin G ₁ , aflatoxin G ₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An.....	105
4.2.1. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin B ₁ , aflatoxin B ₂ , aflatoxin G ₁ , aflatoxin G ₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền	105
4.2.2. Tỷ lệ, thành phần loại aflatoxin	112
4.2.3. Một số yếu tố nguy cơ nhiễm aflatoxin	114
4.3. Kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền	118
KẾT LUẬN	124
KIẾN NGHỊ.....	126
TÍNH KHOA HỌC, TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI	127
CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN KẾT QUẢ CỦA LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1 Một số tính chất hóa lý của aflatoxin	21
Bảng 2.1. Các biến số sử dụng trong nghiên cứu.....	37
Bảng 2.2. Các biến số, chỉ số sử dụng trong nghiên cứu	45
Bảng 2.3. Giới hạn ô nhiễm aflatoxin trong một số thực phẩm theo tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT	49
Bảng 2.4. Các biến số sử dụng trong nghiên cứu.....	55
Bảng 3.1. Đặc điểm các mẫu thuốc trong nghiên cứu)	59
Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc bắc và thuốc nam	60
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền có nguồn gốc là thân, rễ, lá, củ, quả, con	61
Bảng 3.4. Kết quả xác định số lượng mẫu nấm khác nhau về đặc điểm hình thái học)	61
Bảng 3.5. Kết quả xác định giống nấm phân lập nấm từ các vị thuốc cổ truyền dựa vào đặc điểm hình thái	62
Bảng 3.6. Tổng hợp các trình tự thu được trong nghiên cứu này và đăng ký trên ngân hàng gen	66
Bảng 3.7. Tỷ lệ các loài nấm trong giống Aspergillus.....	69
Bảng 3.8. Phân bố các loài nấm trong giống Aspergillus	70
Bảng 3.9. Tỷ lệ các loài nấm khác	71
Bảng 3.10. Tỷ lệ nhiễm nấm Aspergillus ở thuốc bắc, thuốc nam	72
Bảng 3.11. Tỷ lệ nhiễm nấm khác ở thuốc bắc và thuốc nam	72
Bảng 3.12. Tỷ lệ nhiễm nấm theo nguồn gốc	72
Bảng 3.13. Tỷ lệ nhiễm Aspergillus theo các bộ phận của thuốc	73
Bảng 3.14. Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác thuốc theo bộ phận thuốc.....	73
Bảng 3.15. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin theo số loại aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền	77
Bảng 3.16. Tỷ lệ nhiễm từng loại aflatoxin G1, G2, B1, B2 ở các mẫu thuốc cổ truyền	78
Bảng 3.17. Tỷ lệ nhiễm từng loại aflatoxin G1, G2, B1, B2 ở các mẫu thuốc cổ truyền	78
Bảng 3.18. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm và không nhiễm nấm.....	79
Bảng 3.19. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở mẫu thuốc theo các bộ phận.....	79

Bảng 3.20. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin	80
Bảng 3.21. Liên quan giữa nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nhiễm nấm <i>Aspergillus</i>	80
Bảng 3.22. Liên quan giữa nhiễm các loài nấm khác với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền	81
Bảng 3.23. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc nam và thuốc bắc	81
Bảng 3.24. Độ thu hồi xét nghiệm định lượng hàm lượng aflatoxin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ở các mẫu nhiễm nấm.....	82
Bảng 3.25. Tổng hợp tỷ lệ thu hồi từng loại aflatoxin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao ở các mẫu thuốc nhiễm nhiễm nấm.....	84
Bảng 3.26. Kết quả tổng hợp xét nghiệm định lượng hàm lượng aflatoxin	85
Bảng 3.27. Hàm lượng độc tố trong các mẫu nhiễm aflatoxin	86
Bảng 3.28. Hàm lượng aflatoxin ở mẫu nhiễm nấm và không nhiễm nấm	86
Bảng 3.29. Hàm lượng aflatoxin ở mẫu thuốc bắc và thuốc nam.....	86
Bảng 3.30. Tỷ lệ mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT	87
Bảng 3.31. Liên quan giữa nhiễm nấm ở các vị thuốc cổ truyền với nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn	87
Bảng 3.32. Trang thiết bị lắp đặt cho 1 nhà kho trước và sau can thiệp.....	88
Bảng 3.33. Kết quả kiểm tra định kỳ kho thuốc và chất lượng thuốc sau can thiệp.....	89
Bảng 3.34. Thay đổi các yếu tố vi khí hậu trong kho thuốc số 1 sau 12 tháng	90
Bảng 3.35. Thay đổi các yếu tố vi khí hậu trong kho thuốc số 2 sau 12 tháng	91
Bảng 3.36. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền trước và sau can thiệp 12 tháng tại 2 kho thuốc.....	92
Bảng 3.37. Tỷ lệ nhiễm nấm <i>Aspergillus</i> trước và sau can thiệp ở các mẫu thuốc cổ truyền tại 2 kho	92
Bảng 3.38. Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác trước và sau can thiệp 12 tháng.....	93

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh một số loài <i>Aspergillus</i>	4
Hình 1.2. Cơ chế sinh tổng hợp aflatoxin	23
Hình 1.3. Kết quả PCR (+) với <i>Aspergillus</i> sp và <i>Candida</i> spp	26
Hình 1.4. Kết quả xét nghiệm PCR (+) với <i>Aspergillus fumigatus</i>	26
Hình 2.1: Khuẩn lạc nấm mọc trong môi trường nuôi cấy	39
Hình 2.2. Tóm tắt các bước thực hiện kỹ thuật PCR	43
Hình 3.1. Tỷ lệ nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền	59
Hình 3.2. Khuẩn lạc nấm nuôi cấy trong môi trường Saboraud	60
Hình 3.3. Hình ảnh sợi nấm, bào tử <i>Aspergillus</i> trong tiêu bản nhuộm Methylene blue trong nghiên cứu này	62
Hình 3.4. Sản phẩm điện di một số mẫu nấm phân lập từ các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An.....	63
Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen các mẫu <i>Aspergillus</i> spp	64
Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen các mẫu nấm khác	65
Hình 3.7. Kết quả điện di trên thạch và giải trình tự gen.....	66
Hình 3.8. Sắc ký đồ mẫu (+) aflatoxin B1, B2, G1, G2 theo thời gian lưu mẫu	74
Hình 3.9. Sắc ký đồ mẫu(-) với aflatoxin B1, B2, G1, G2 theo thời gian lưu mẫu	75
Hình 3.10: Đường cong ROC của nồng độ aflatoxin B1, B2	76
Hình 3.11: Đường cong ROC của nồng độ aflatoxin G1, G2.....	76
Hình 3.12. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin trong các mẫu thuốc cổ truyền	77

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm là những sinh vật có nhân và thành tế bào thực sự, dị dưỡng, sinh sản bằng bào tử, phân bố rộng rãi trong tự nhiên, phần lớn sống hoại sinh trong đất, số ít có khả năng ký sinh và gây bệnh cho người và động vật. Ước tính trên thế giới có trên 1 triệu loài nấm. Có loại nấm có lợi, có loại có hại cho sức khỏe con người [1], [2]. Với sự đa dạng và phong phú của nấm người ta còn xếp nấm thành 1 giới riêng là “*giới nấm*”. Hiện nay, khoa học đã phát hiện khoảng trên 400 loài nấm có khả năng gây bệnh cho người [3], [4], [5].

Thuốc cổ truyền thường được chế biến theo phương pháp như phơi, sấy, tẩm đường, mật... Trong điều kiện khí hậu nhiệt đới nóng ẩm của nước ta và quá trình bảo quản, vận chuyển, phân phối không tốt do thiếu thốn phương tiện và kỹ thuật bảo quản, các thuốc cổ truyền rất dễ bị ẩm mốc và nhiễm các độc tố của nấm như aflatoxin. Các nhà khoa học đã xác định thuốc cổ truyền là các sản phẩm sau thu hoạch thường nhiễm các loài nấm *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*... trong đó có vai trò y học quan trọng nhất là *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) [5], [6], [7].

Nấm khi hoại sinh ở các sản phẩm nông nghiệp như lương thực, hoa quả và dược liệu sinh ra các độc tố. Các độc tố gồm trên 20 loại aflatoxin như aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂...[8], [9] và hàng trăm loại Ergotalkanoloids, Ergotamine, ergocristine, ergokryptine có tác hại với sức khỏe con người [10], [11], [12]. Khi người sử dụng các sản phẩm nông nghiệp, thuốc cổ truyền nhiễm nấm và có thể nhiễm các độc tố aflatoxin. Độc tố nấm có thể gây nhiều tác hại, đặc biệt là ung thư gan nguyên phát do độc tố aflatoxin [13], [14]. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) năm 2018 và Tổ chức Nông Lương thế giới (FAO) khuyến cáo aflatoxin và fumonisin B₁ (FB₁) cần được kiểm soát chặt chẽ trong các sản phẩm nông nghiệp và các sản phẩm làm thuốc cổ truyền. Các nước cần có bộ công cụ là khung pháp lý đủ mạnh giám sát hàm lượng aflatoxin cùng các độc tố khác do nấm sinh ra, phát triển các kỹ thuật phát hiện nấm, phát hiện các độc tố do nấm nhằm kiểm soát từ khâu sản xuất đến lưu

thông phân phối các sản phẩm nông nghiệp – dược liệu, nhằm bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng [15], [16]. Năm 2020, Mary T. Fleycher đã tổng hợp các nghiên cứu tại Pakistan cho thấy mức độ ô nhiễm aflatoxin trầm trọng, ông đã nhấn mạnh sự cần thiết về tính an toàn thực phẩm và các sản phẩm nông nghiệp, đặc biệt cần kiểm soát chặt chẽ aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ vì các chất này gây ra rủi ro rất lớn cho sức khỏe con người [17].

Tại Việt Nam, cho đến nay có rất ít các công trình nghiên cứu sâu về dịch tễ học nhiễm nấm trên các vị thuốc cổ truyền. Tại Nghệ An Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm và aflatoxin B₁, một câu hỏi đặt ra là ngoài nhiễm aflatoxin B₁ thì tỷ lệ nhiễm các aflatoxin B₂, aflatoxin M₁, aflatoxin M₂ ở thuốc y học cổ truyền như thế nào?, trong khi luôn tồn tại các yếu tố nguy cơ ô nhiễm nấm và các độc chất do nấm. Với tính cấp thiết của vấn đề và để trả lời cho câu hỏi trên, chúng tôi thực hiện đề tài: *Một số đặc điểm nhiễm nấm, độc tố nấm trên thuốc cổ truyền và kết quả can thiệp tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An (2023 - 2025)*, với các mục tiêu:

1. *Xác định tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trong một số vị thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An, năm (2023 -2025).*

2. *Phân tích tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An, năm (2023 – 2025).*

3. *Đánh giá kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền*

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Một số khái niệm và thuật ngữ sử dụng trong nghiên

1.1.1. Khái niệm về nấm

Nấm là những sinh vật có nhân thật và thành tế bào thực sự, dị dưỡng, sinh sản bằng bào tử, phân bố rộng rãi trong tự nhiên, phần lớn sống hoại sinh trong đất, một số ít có khả năng ký sinh gây bệnh cho thực vật và động vật. Nấm được xếp vào 1 trong 5 loại hình thái tạo nên sự sống trên trái đất. Nấm có vị trí phân loại học như sau [18]:

Giới:	Fungi
Ngành:	Ascomycota
Lớp:	Saccharomycetes
Bộ:	Saccharomycetales
Họ:	Saccharomycetaceae
Chi (giống):	<i>Aspergillus</i> ; <i>Penicilium</i> ..

1.1.2. Nấm y học

Nấm y học (Medical mycology) nghiên cứu nấm ký sinh ở người, và tự nhiên về đặc điểm sinh học, khả năng gây bệnh, chẩn đoán, điều trị và phòng bệnh do nấm gây nên. Hầu hết các loài nấm y học có kích thước nhỏ chỉ phát hiện bằng kính lúp hoặc kính hiển vi nên gọi là vi nấm [19], [20].

Đa số các nhà khoa học trong và ngoài nước hiện nay đều phân chia các bệnh nấm thành hai nhóm bệnh [3], [21] chính là: Nhóm nấm da và nấm ngoại biên (Dermatophytosis) [22], [23], thường gặp các loài nấm ưa keratin và chất acid béo; Nhóm nấm nội tạng như: Nấm máu, nấm phổi, nấm dịch não tủy, nấm đường tiêu hóa, nấm đường sinh dục. Ngoài ra còn có một số cách phân loại bệnh nấm bằng vị trí tổn thương lâm sàng và vị trí ký sinh, như: Nấm da, nấm tóc, nấm phổi, nấm sinh dục, nấm tiêu hóa. Nấm gây bệnh cho người có tính

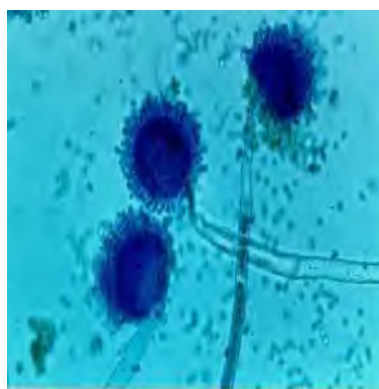
chất cơ hội, nhất là ở những người suy giảm miễn dịch như người nhiễm HIV/AIDS, người đái tháo đường, người nhiễm các virus có khả năng đàn áp miễn dịch [24], [25].

1.1.3. Nấm mốc

Nấm mốc ký sinh gây bệnh chủ yếu ở thực vật, lương thực, thực phẩm, một số loài gây bệnh trực tiếp cho con người, nhưng thường gián tiếp qua các độc tố của nấm như các độc tố aflatoxin, ochatoxin, fumonisin, thường gặp các loài nấm *Aspergillus* spp, *Penicilium* spp [3], [7], [17].



Aspergillus fumigatus



Aspergillus flavus



Aspergillus niger

Hình 1.1. Hình ảnh một số loài *Aspergillus* (nguồn CDC-USA)

Tổ chức Nông Lương thế giới (FAO) ước tính hằng năm 25% sản lượng lương thực, thực phẩm phải hủy bỏ do ô nhiễm nấm và các độc tố của nấm. Nguyên nhân là do có hạn chế trong thu hoạch, bảo quản, đặc biệt tại Châu Phi thì tình trạng ô nhiễm các chất độc do nấm sinh ra là rất trầm trọng, ảnh hưởng rất xấu tới sức khỏe người dân [26]. Tình trạng nhiễm độc tố do nấm có xu hướng ngày càng tăng cao trên toàn thế giới nhất là ở Nam Á, châu Phi [27], FAO khuyến cáo các nước cần có công cụ hữu hiệu kiểm tra giám sát hàm lượng các chất độc do nấm sinh ra trong lương thực, thực phẩm để bảo vệ sức khỏe người dân [26].

1.1.4. Lịch sử nghiên cứu nấm và độc tố nấm trên thế giới

Nấm *Aspergillus* spp đã được các nhà khoa học xác định là loài nấm có vai trò vô cùng quan trọng gây ra tình trạng ô nhiễm nấm ở thực phẩm, các chế phẩm nông nghiệp, các chế phẩm thuốc cổ truyền... *Aspergillus* spp lần đầu tiên được xếp vào danh mục nấm y học là năm 1729 bởi một linh mục và là nhà sinh vật học người Ý Pier Antonio Micheli. Ông đã quan sát nấm dưới kính hiển vi và mô tả nấm có hình dạng của một aspergillum (vòi phun nước). Sau này nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu và mô tả “*Aspergillum*”, và thấy đây là loài sinh vật sinh sản vô tính, cấu trúc hình thể điển hình tương tự như hình ảnh đài phun nước hoặc bông hoa cúc, sinh sản vô tính...giống với mô tả của Pier Antonio Micheli. Ngày nay *Aspergillum* được các nhà khoa học đặt tên chính thức trong mục lục của ngành nấm là *Aspergillus* spp [3], [28], [29]. Bằng kết hợp kỹ thuật PCR và giải trình tự gen kết hợp với các kỹ thuật truyền thống các nhà khoa học đã xác định *Aspergillus* spp có 700 loài trong đó có 19 loài gây bệnh cho người [30], [31], [32], các loài phổ biến gồm *Aspergillus flavus*; *Aspergillus moninus*; *Aspergillus parasiticus*; *Aspergillus elegans*, *Aspergillus fresenii*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus pertrakii*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus screrotium*.

Ngày nay, các kỹ thuật sinh học phân tử, giải trình tự gen... Đã được ứng dụng ngày càng nhiều để chẩn đoán xác định tỷ lệ, thành phần loài nấm cũng như vai trò sinh độc tố và vai trò y học của nấm [33], [34].

Nghiên cứu tại Brazil của Fabiana Aparecida Couto (2014), về sự đa dạng quần thể nấm dạng sợi trong các hạt cà phê trồng theo cách truyền thống và hữu cơ, kết quả: Từ 18 mẫu cà phê đã phân lập được 346 chủng nấm, với 32 loài, 12 chi gồm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* [34]. Margit Hummel (2004), sử dụng kỹ thuật PCR lồng chẩn đoán nhiễm *A. fumigatus* chủng ATCC 9197 ở chuột [35]. Kết quả nghiên cứu đã mở đường cho các nhà khoa học sau này sử dụng phương pháp

PCR lồng để phát hiện DNA của *A. fumigatus* như nghiên cứu của Tăng Xuân Hải [36]. White .P.L (2006) [37], Dirina Pickova (2021) [38].

Tại Thổ Nhĩ Kỳ Dirina pickova (2021), các nhà khoa học đã phát hiện 100 ngàn con gà tây con đã chết do căn bệnh “X”, nguyên nhân ăn lạc Brazil nhiễm *Aspergillus flavus*, từ đây các nhà khoa học đã xác định được mẫu thức ăn có nồng độ aflatoxin vượt ngưỡng an toàn nhiều lần. Đến nay các nhà khoa học đã xác định được trên 20 loại aflatoxin và được mô tả kỹ trong các công trình khoa học, trong đó có vai trò nổi bật của aflatoxin B1, B2, G1 và G2. Đến nay việc phòng chống ô nhiễm aflatoxin trong các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch đã trở thành vấn đề sức khỏe toàn cầu [38]

1.1.5. Lịch sử nghiên cứu nấm và độc tố nấm tại Việt Nam

Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu về nấm mới chỉ xuất hiện từ đầu thế kỷ 20 bởi các nhà khoa học Pháp và một số ít công trình của người Việt. Việc nghiên cứu mới được báo cáo nhiều trong những năm gần đây. Hiện nay với sự phát triển của khoa học trong đó có các kỹ thuật mới như: Enzym, miễn dịch học, công nghệ PCR... đã làm cho việc nghiên cứu nấm đạt được nhiều thành tựu [39], [40], [41]. Một số công trình tiêu biểu:

- Do cấu tạo của các tế bào nấm có thành vách và có khoảng trống giữa nhân và thành tế bào vì vậy việc điều trị nội khoa hết sức khó khăn, nhiều trường hợp phải sử dụng ngoại khoa kết hợp với nội khoa. Việc nghiên cứu chất kháng nấm *Aspergillus* spp đã phát triển mạnh cả ở trong và ngoài nước tuy nhiên kết quả vẫn còn hạn chế [42], [43], [44].

Tại nước ta, các công trình nghiên cứu về nấm ở thực phẩm phát triển muộn hơn nghiên cứu nấm gây bệnh ở người, tuy nhiên đã có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật sâu như: Miễn dịch, sắc ký lỏng hiệu năng cao, sắc ký khối phổ, kỹ thuật PCR để xác định sự có mặt của nấm và độc tố của nấm mốc, điển hình là nghiên cứu của:

- Nguyễn Đình Nga (2012), nghiên cứu nhiễm nấm và aflatoxin trong một

số được liệu tại ở Quận 5 Thành phố Hồ Chí Minh bằng định danh loài dựa vào hình thái học và định lượng aflatoxin bằng Kit ELISA, kết quả: 86/141 mẫu được liệu khảo sát có mức độ nhiễm nấm vượt ngưỡng 500 CPU/gam, các loài nấm thường gặp là *A. niger*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *Penicillium* và nấm men, có 31/55 mẫu có hàm lượng aflatoxin B1 vượt ngưỡng 5 ppb chiếm 56,36% [14].

- Lý Thu Hương (2012), nghiên cứu tình trạng nhiễm nấm trong đất và rễ cây trồng bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao xác định sự có mặt và hàm lượng các chất độc tố do nấm sinh ra [42].

- Bùi Thị Mai Hương (2012), nghiên cứu ô nhiễm các chất độc do nấm trong gạo bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, bằng cách tính toán lượng tiêu thụ gạo, ngô và sự tích lũy các chất độc aflatoxin B1 và fumonisin B1 tác giả đã đưa ra nguy cơ K gan ở đối tượng nghiên cứu [13].

- Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu 505 mẫu thuốc cỏ truyền tại các bệnh viện tỉnh Nghệ An bằng nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud kết hợp định lượng aflatoxin bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, kết quả cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm 51,8%, nhiễm aflatoxin là 4,75%(24/505). Trong 24 thuốc cỏ truyền nhiễm aflatoxin có 66,66%(16/24) vượt tiêu chuẩn Việt Nam cho phép (QCVN 8-1:2011/BYT) [46], [47].

- Nguyễn Thu Mai và CS (2009), phân lập nấm từ hạt đậu phộng ở các chợ Thành phố Cần Thơ, sau khi định danh sơ bộ bằng kỹ thuật hình thái đã xác định được 4 loài *Aspergillus* gồm *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficinum* [48] .

- Tại Tây Nguyên Nguyễn Vũ Thuận và CS (2022), nghiên cứu mức độ nhiễm nấm và aflatoxin trong ngô, lạc tại một số gia đình huyện Ea H'leo, Cư M' Gar, Kroong Pắc tỉnh Đắk Lắk kết quả có 48,7% mẫu ngô, lạc nhiễm nấm vượt tiêu chuẩn cho phép, trong đó 56,6% mẫu ngô, 33,3% mẫu lạc, đã xác định chủng *Aspergillus flavus* trong 14,1% mẫu ngô, 11,8% mẫu lạc. Tỷ lệ

nhiễm aflatoxin chiếm 12,7% của các mẫu ngô, lạc [49].

Nguyễn Thị Xuân và CS (2022), cũng có nghiên cứu về tình trạng sinh độc tố aflatoxin trong các mẫu ngô, lạc và đất trồng bằng kỹ thuật PCR, từ 32 chủng nấm được phân lập đã xác định được 4 chủng cho kết quả (+) với 4 gen *aflr*, *avfa*, *omtA* và *ver-1* có vai trò sinh aflatoxin [46]. Lê Thị Hoàng Yến và CS (2025), nghiên cứu ô nhiễm aflatoxin trong tương truyền thống, kết quả: có 35/38 mẫu tương không phát hiện được aflatoxin, chỉ có 3/38 mẫu có hàm lượng aflatoxin có aflatoxin nhưng dưới ngưỡng cho phép theo tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT. Kết quả này khẳng định các thực phẩm lên men truyền thống rất an toàn nếu được thực hiện đúng quy trình kỹ thuật [50]

1.2. Đặc điểm dịch tễ nhiễm nấm

1.2.1 Tác nhân nấm

1.2.1.1. Phân bố của các loài nấm

Nấm mốc có hại gây hỏng lương thực, thực phẩm, hỏng các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch, chỉ một số ít có lợi như nấm tương, nấm men bia. Trong đề tài này chỉ đề cập nghiên cứu các loài nấm có hại cho các mẫu thuốc cổ truyền và sức khỏe con người. Các tác nhân nấm gây hỏng thực phẩm có nhiều loài *A. fumigates*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus moninus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus elegans*, *Aspergillus fresenii*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus pertrakii*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus screrotium*, *Penicilium viriditum*, *Penicilium spp*, phổ biến nhất là *Aspergillus flavus* [45], [47], [48], nấm phân bố như sau:

- Nấm trong kho chứa chủ yếu là *Aspergillus spp* và *Penicilium spp*
- Nấm ngoài đồng ruộng *Fusarium spp* và *Trichothecenes spp*

Như vậy, tác nhân nấm trong các vị thuốc cổ truyền chủ yếu là *Aspergillus spp* và *Penicilium spp*, trong đó vai trò quan trọng nhất là *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*. Nấm thường ký sinh chủ yếu trong các sản phẩm nông nghiệp

và các chế phẩm thuốc cổ truyền thường gặp ở củ, quả mốc như: Gạo, lạc, vừng, ngô mốc... kể các các vị thuốc đông y do bảo quản không tốt. Ở điều kiện thuận lợi nấm mốc thành sợi có màu trắng bạc như khói, có thể tồn tại ở dạng nấm men có hình cầu hoặc bầu dục. Nấm phát triển rất mạnh trong điều kiện độ ẩm cao $> 70\%$, nhiệt độ $> 25^{\circ}\text{C}$, thiếu ánh sáng, tốc độ gió nhỏ $< 0,5$ m/giây [51], [52]. Khi ký sinh trong các sản phẩm nông nghiệp như gạo, ngô, sắn và các chế phẩm đông được...nấm sản sinh ra nhiều độc tố mycotoxin, trong nhóm mycotoxin nguy hiểm nhất là aflatoxin và ochratoxin đây là nguyên nhân gây ra ngộ độc thực phẩm cấp và mạn tính [53], [54], [55].

1.2.1.2. Vai trò sinh aflatoxin của các loài nấm

Bằng kỹ thuật PCR định danh loài nấm và kỹ thuật xét nghiệm aflatoxin ở từng mẫu nhiễm từng loài nấm các nhà khoa học đã chứng minh aflatoxin được sinh ra từ *Aspergillus ochraceus* là chủ yếu [56], [57], [58], ngoài ra một số loài *Aspergillus elegans*, *Aspergillus fresenii*, *Aspergillus melleus*, *Aspergillus pertrakii*, *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus screrotium*...cũng tạo ra aflatoxin và ochratoxin A với lượng nhỏ. Các loài nấm *Penicilium* spp có khả năng sinh aflatoxin A bao gồm: *Penicilium viridicatum*, *Penicilium verrucosum*, *Penicilium chrysogenum*, *Penicilium commune*, *Penicilium cyclopium*, *Penicilium palitans* tuy nhiên hàm lượng aflatoxin không lớn [57], [59], [60].

- Tại Trung Quốc, nền y học cổ truyền phát triển từ hơn 5000 năm trước, việc sử dụng thảo dược là cây, con làm thuốc được sử dụng rộng rãi, trong quá trình chế biến một tỷ lệ không nhỏ nhiễm nấm và các sản phẩm chuyển hóa của nấm mốc nhất là aflatoxin B1, B2, G1, G2 vì vậy, cần đưa quy trình xác định, phân tích aflatoxin nhằm kiểm soát chất lượng thảo dược là cần thiết. Năm 2020, các nhà khoa học Trung Quốc đã tổng hợp, phân tích từ các báo cáo trong nước về tỷ lệ nhiễm nấm và phân bố rộng rãi nhất cũng như vai trò sinh độc tố aflatoxin của *Aspergillus flavus*. Kết quả báo cáo cho thấy nhiều mẫu thực

phẩm có hàm lượng aflatoxin vượt ngưỡng nhiều lần cho phép [61], [62].

- Đào Thiện và CS (2012), nghiên cứu mô hình hóa và dự báo quá trình phát triển của nấm nhằm đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển của các loại nấm trên thực phẩm, chế phẩm nông nghiệp, thuốc cổ truyền... trong một điều kiện vi khí hậu nhất định. Thời gian nảy mầm là một tiêu chí đầu tiên và cần thiết để xác định tuổi thọ và hạn sử dụng của một sản phẩm thực phẩm. Vì song song với quá trình phát triển của nấm là quá trình sinh độc tố, độc tố sản sinh nhiều nhất vào giai đoạn từ nảy trời tăng sinh về số lượng phát triển thành nấm sợi. Nấm sinh độc tố nhằm mục đích cạnh tranh, tiêu diệt các vi khuẩn, virus và các sinh vật khác về nguồn dinh dưỡng của nấm [53].

1.2.1.3. Nấm *Aspergillus* spp

Aspergillus spp có khả năng sinh độc tố nhiều nhất trong các loài nấm y học, các độc tố chủ yếu là aflatoxin chiếm tới 90% độc tố của nấm. *Aspergillus* spp có 700 loài trong đó có 20 loài gây bệnh cho người. *Aspergillus* spp có các đặc điểm sinh học cơ bản như sau: Là nấm sợi, phần lớn sống hoại sinh trong đất, trong các chế phẩm nông nghiệp kể cả các chế phẩm thuốc cổ truyền, trong phân chim, lông của các loài gia cầm sinh ra rất nhiều bào tử rụng định kỳ phát tán theo gió, do đó con người thường xuyên tiếp xúc với bào tử nấm [29], [40], [42]. Bộ phận bào tử của nấm *Aspergillus* spp có cấu trúc đặc biệt gồm: Đỉnh bào đài mọc từ tế bào chân, ngọn đỉnh bào đài, tiểu bào đài, trên tiểu bào đài sinh ra các bào tử có kích thước (2-5 μ m), trông như bông hoa cúc [18]. *Aspergillus* spp là nấm ưa khí, chính vì vậy khi gây bệnh ở phổi thường [63], [64].

1.2.2. Đường lan truyền của nấm

Trong tự nhiên các bào tử nấm nhờ gió phát tán trong không khí khi tiếp xúc với lương thực, thực phẩm, chế phẩm sau thu hoạch nếu gặp điều kiện thuận lợi như nhiệt độ, độ ẩm, dinh dưỡng phù hợp sẽ phát triển thành sợi nấm và khuẩn lạc nấm [2]. Đối với con người, hầu hết các loài nấm có đường truyền

bệnh qua hô hấp, các bào tử nấm phát tán trong không khí, con người tiếp xúc hít thở các bào tử nấm vào phổi. Ngoài ra một số loài nấm có thể xâm nhập vào cơ thể qua đường da, niêm mạc qua tiếp xúc trực tiếp...[2].

1.2.3. Khôi cảm thụ

Đối với thuốc cổ truyền, lương thực, thực phẩm và tự nhiên: Các bào tử nấm nhờ gió phát tán trong không khí khi tiếp xúc với lương thực, thực phẩm, chế phẩm sau thu hoạch nếu gặp điều kiện thuận lợi như dinh dưỡng đầy đủ, độ ẩm cao, nhiệt độ phù hợp, cường độ tia bức xạ thấp....sẽ phát triển thành sợi nấm và khuẩn lạc nấm, đồng thời sinh ra độc tố aflatoxin gây hại cho thực phẩm và thuốc cổ truyền[2].

Đối với người: Khôi cảm thụ của các loài nấm *Aspergillus* spp và *Penicilium* spp cũng như các loài nấm khác là người suy giảm miễn dịch như người bệnh HIV/AIDS, đái tháo đường, người bệnh lao hang, người sống trong môi trường ẩm ướt trật trối mất vệ sinh, thiếu ánh sáng [64], [65].

1.2.4. Các yếu tố liên quan đến nhiễm nấm

Các yếu tố liên quan đến nhiễm nấm trong thuốc cổ truyền có rất nhiều, trong đó một số yếu tố có vai trò quan trọng như: Vi khí hậu phù hợp cho nấm phát triển, điều kiện bảo quản kém, tình trạng dinh dưỡng nơi nấm ký sinh phù hợp và các yếu tố về kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống nhiễm nấm của người dân. Kết hợp với các yếu tố miễn dịch của vật chủ là động vật là nguyên liệu làm thuốc cổ truyền [66].

1.2.4.1 Các yếu tố về khí hậu và vi khí hậu

Bao gồm: Các yếu tố khí hậu và vi khí hậu. Yếu tố khí hậu là chỉ khí hậu của một vùng, miền, một địa phương. Vi khí hậu là các yếu tố nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ gió, cường độ ánh sáng trong một phạm vi hẹp như 1 phòng làm việc, 1 nhà xưởng. Trong phạm vi nghiên cứu này là các yếu tố vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền, gồm:

- Nhiệt độ trung bình $> 25^{\circ}\text{C}$, thường xuyên thay đổi cũng làm cho nấm phát triển. Nấm sinh độc tố mạnh nhất ở nhiệt độ 28°C đến 30°C

- Độ ẩm cao, nếu độ ẩm tương đối cao $> 70\%$.

- Tốc độ gió có tác dụng phát tán các bào tử nấm ra môi trường xung quanh. Nấm phát triển mạnh ở môi trường có tốc độ gió $< 0,5\text{m/s}$ hoặc $> 1\text{m/s}$

Nhiễm aflatoxin trong các sản phẩm nông nghiệp đối với con người đã trở thành vấn đề sức khỏe toàn cầu, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển nấm như: Thời tiết nóng ẩm, thiếu phương tiện và kỹ thuật bảo quản có vai trò then chốt trong quá trình ô nhiễm nấm trong thực phẩm, quy trình chế biến, vận chuyển và phong tục tập quán sử dụng thực phẩm sau thu hoạch cũng có vai trò quan trọng. Tổ chức nông lương thế giới khuyến cáo mỗi quốc gia cần có bộ tiêu chuẩn giám sát aflatoxin, kỹ thuật định lượng aflatoxin, ngưỡng an toàn cho phép và đồng thời nâng cao kiến thức của người dân trong phòng chống nhiễm độc tố sinh ra do nhiễm nấm [67]

Tại Việt Nam và Thế giới có một số công trình nghiên cứu về các yếu tố liên quan đến nhiễm nấm [41], [47], các tác giả cũng có chung kết luận sự kết đồng thời 3 yếu tố vi khí hậu nhiệt độ cao, độ ẩm cao, tốc độ thông gió nhỏ là điều kiện thuận lợi cho nấm phát triển.

- Đào Thiện và CS (2012), đã nghiên cứu mô hình hóa và dự đoán quá trình phát triển của nấm nhằm mục đích đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển của các loại nấm trên thực phẩm, chế phẩm nông nghiệp...tác giả đã áp dụng mô hình của Gompertz như sau [53]:

$$\text{Mô hình Gompertz: } P = A \exp(-\exp[\mu_{\text{me}}/A (\lambda - t) + 1]) \quad (1)$$

$$\text{Mô hình Logistic: } P = P_{\text{max}}/[1 + \exp(k (\lambda + t))] \quad (2)$$

Ứng dụng các mô hình trên, có thể ước lượng được thời gian cần thiết để đạt được tỷ lệ (%) bào tử nấm nảy mầm nhất định. Ví dụ, thời gian cần có để tại đó có 50% số bào tử nảy mầm được tính toán theo phương trình (1):

$t_i = \lambda + A/(\mu m e)$ (3) và $t_i = t$ lần lượt cho các phương trình (1) và (2).

Thời gian nảy mầm là một tiêu chí đầu tiên và cần thiết để xác định tuổi thọ và hạn sử dụng của một sản phẩm thực phẩm. Sự nảy mầm đánh dấu sự bắt đầu xuất hiện hệ sợi nấm trên các sản phẩm thực phẩm và chế phẩm đông được. Tuy nhiên, các bào tử nảy mầm cần phải được quan sát dưới kính hiển vi, theo kết quả nghiên cứu đã xây dựng được các mô hình nhằm dự đoán sự phát triển và nảy mầm của một số loại nấm cụ thể theo hình 3 với hệ số hồi quy xấp xỉ 1. Với khó khăn gặp phải khi sợi nấm không là các cá thể riêng biệt như trường hợp thường gặp với vi khuẩn, vì vậy cần xây dựng một phương pháp đánh giá khả năng phát triển của các loại nấm. Trên môi trường rắn, phương pháp thường được sử dụng là xác định sự phát triển của đường kính khuẩn lạc của một bào tử (hoặc một số lượng bào tử nhất định) theo thời gian (mm.d^{-1}). Với phương pháp này, giúp xác định được thời gian trễ hay thời gian bắt đầu có sự nảy mầm của nấm. Thời gian trễ cũng sẽ phụ thuộc vào số lượng bào tử ban đầu [53].

Ngoài nghiên cứu của Đào Thiện, Phan Thị Kim Liên (2019), có nghiên cứu về ảnh hưởng các điều kiện nhiệt độ, hoạt độ nước theo mùa vụ lên sự hô hấp và tổn thất chất khô Tác giả nhận thấy ở điều kiện (27°C , 30°C , 33°C) và hoạt độ nước (0,93 aw, 0,96 aw và 0,99 aw) lên tốc độ hô hấp (R), và tổn thất chất khô (Dry matter losses -LDML) trên gạo nhiễm *Aspergillus flavus*, kết quả cho thấy: tại 30°C và 0,99aw có ảnh hưởng nhiều nhất đến tốc độ tăng trưởng của nấm, lượng CO_2 sinh ra trong quá trình hô hấp $1728\text{gCO}_2/\text{kg}$ ở ngày thứ 10 và tổn thất hạt gạo đạt 56,7%. Từ kết quả này nhóm tác giả có khuyến cáo người dân nên bảo quản gạo ở hoạt độ nước thấp để hạn chế nấm phát triển và sinh độc tố tránh hao hụt chất lượng gạo [68]

1.2.4.2 Các yếu tố về điều kiện bảo quản

Theo Tổ chức Nông Lương Thế giới (FAO), khoảng 50,0% sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch nhiễm nấm trong đó 25% ngũ cốc cung cấp cho con người có chứa một lượng mycotoxin và aflatoxin. Nguyên nhân do hạn chế

trong khâu thu hoạch, bảo quản, đặc biệt tại Châu Phi thì tình trạng ô nhiễm các chất độc do nấm là rất trầm trọng, ảnh hưởng rất xấu tới sức khỏe người dân [26], [54]. Các nhà khoa học cùng thống nhất nhận định các yếu tố liên quan đến tình trạng nhiễm nấm trong lương thực, thực phẩm là: Chất liệu bao gói bảo quản các sản phẩm sau thu hoạch, kể cả các sản phẩm đông được bằng chất liệu gì? Có đảm bảo kín, không chế độ ẩm, nhiệt độ, ngăn không cho bào tử nấm xâm nhập hay không; Các chất bảo quản các sản phẩm sau thu hoạch như các sản phẩm đông được, về nguyên tắc không được phép sử dụng các hóa chất bảo quản, chỉ sao khô, bao gói kín... nhưng trong thực tế nhiều nhà thuốc sử dụng hơi lưu huỳnh ở dạng xông khói nhằm tiêu diệt các mầm bệnh và nấm. Đây là một hóa chất độc có hại cho sức khỏe con người; Các yếu tố về điều kiện canh tác và hóa chất bảo vệ thực vật...không tốt cũng làm cho các vị thuốc đông được nhiễm các mầm bệnh nấm.

1.2.4.3. Các yếu tố về thực hành bảo quản thuốc cổ truyền và các sản phẩm sau thu hoạch

Cho đến nay, tại Việt Nam gần như chưa có nghiên cứu về kiến thức, thái độ và thực hành phòng chống nấm cho thuốc cổ truyền [46], [47]. Việc bảo quản thuốc chủ yếu dựa vào kinh nghiệm dân gian như: Phơi, sấy, tẩm, ướp, bảo quản nơi khô ráo [69], [70]. Khi thuốc có dấu hiệu mốc thì phơi, sấy để sử dụng lại, điều này là hết sức nguy hiểm vì: Độc tố của nhiều loài nấm rất độc với gan, thận, tủy xương... chỉ có rất ít nghiên cứu về kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống nấm cho thực phẩm và thuốc cổ truyền của người dân cũng như cán bộ y tế, một số nghiên cứu như:

- Nghiên cứu của Đặng Bích Thủy (2008), tại Kiến Xương - Thái Bình về thực trạng nhiễm nấm và kiến thức, thái độ, thực hành của người dân về ô nhiễm nấm của các sản phẩm sau thu hoạch cho thấy có 35,6% số mẫu lạc, 48,9% số mẫu đỗ tương được bảo quản trong các đúng cách, tỷ lệ nhiễm nấm ở lạc 13,3% và 24,4% mẫu đỗ tương, chỉ có 13,8% người dân hiểu biết đúng

cách bảo quản và xử trí khi thực phẩm bị nhiễm nấm [71].

- Nguyễn Thị Hải (2017), xác định hàm lượng aflatoxin và xử lý ô nhiễm aflatoxin trong thực phẩm bằng acid sorbic kết hợp hấp ướt trong nông sản, kết quả giảm hàm lượng aflatoxin B1 tới 90,8%, aflatoxin B2 giảm tới 84,1% và aflatoxin G1, G2 giảm 89,21%. Kết quả này cho thấy xử lý aflatoxin trong thực phẩm bằng acid sorbic kết hợp hấp ướt đây là phương pháp làm giảm hàm lượng độc tố do nấm sinh ra rất có hiệu quả và có thể áp dụng rộng rãi tại Việt Nam [59].

- Đào Thiện và CS (2012), đã nghiên cứu thời gian nảy mầm là một tiêu chí đầu tiên và cần thiết để xác định tuổi thọ và hạn sử dụng của một sản phẩm thực phẩm [53].

- Anima J Sirma và CS (2015), nghiên cứu về tình trạng nhiễm aflatoxin do nấm trong ngũ cốc và kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống của nấm của người dân tại Kenya trong 408 mẫu thực phẩm bằng kỹ thuật ELISA và phỏng vấn hộ gia đình, kết quả 77,9% mẫu ngô nhiễm aflatoxin, 92,9% các mẫu kê nhiễm aflatoxin. Gần như 100% người dân không có kiến thức hiểu biết về nấm ở thực phẩm và phương pháp phòng chống nấm [72].

- Gabriel Kigen và CS (2017), Nghiên cứu tình trạng ung thư thực quản và các yếu tố liên quan tại Tây Kenya, nhóm tác giả đã tìm ra căn nguyên do hàm lượng fumonisin từ chuỗi thức ăn có hàm lượng cao gấp nhiều lần cho phép, thực phẩm bảo quản kém, đặc biệt ngô là lương thực chính nhiễm độc tố nấm, rượu nấu từ ngô nên cũng nhiễm aflatoxin. Mặt khác, tỷ lệ nhiễm các virus HPV, viêm gan B, viêm gan C của cộng đồng tương đối cao đã làm tỷ lệ bệnh tăng cao. Các yếu tố về kiến thức, thực hành phòng chống nhiễm vi nấm của người dân có liên quan đến tình trạng nhiễm nấm ở thực phẩm và viêm gan B, viêm gan C trong cộng đồng [73].

1.2.5. Tình hình nhiễm nấm và aflatoxin ở thực phẩm, thuốc cổ truyền và các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch

Theo FAO, khoảng 25% ngũ cốc cung cấp cho con người có chứa một lượng mycotoxin, trong đó có aflatoxin B1 là độc tố phổ biến và nguy hiểm nhất, chiếm tới 75% lượng các độc tố sinh ra do nấm [15]. Tại Châu Á tỷ lệ nhiễm mycotoxin cao hơn Châu Âu và Châu Mỹ do có hạn chế trong thu hoạch, bảo quản sau thu hoạch [15], đặc biệt tại Châu Phi thì tình trạng ô nhiễm các chất độc do nấm sinh ra là rất trầm trọng, ảnh hưởng rất xấu tới sức khỏe người dân. Tình trạng nhiễm độc tố do nấm có xu hướng ngày càng tăng cao trên toàn thế giới [26], [74] điều này thể hiện rõ trong các nghiên cứu sau:

1.2.5.1. Tại Châu Âu, Châu Mỹ

Tại Châu Âu và Mỹ chi phí hàng năm do ô nhiễm độc tố nấm ước tính lên tới 100 triệu đô la Mỹ. Đánh giá hiện tại nhấn mạnh tình hình ở châu Mỹ, nông dân Mỹ tiết kiệm khoảng 17 triệu đô la Mỹ mỗi năm nhờ giảm thiểu thiệt hại do fumonisin và deoxynivalenol gây ra. Vấn đề ô nhiễm vi sinh vật trong thảo dược trầm trọng không chỉ ở Châu Á, mà cả ở Châu Mỹ và nhiều nơi trên thế giới. Năm 2020, Carolina Miranda de Sousa Limma và CS (2020), nghiên cứu tình trạng nhiễm vi sinh vật trong thảo dược, tác giả nhận thấy đối tượng sử dụng thảo dược nhiều nhất là người cao tuổi và đây cũng là đối tượng có nguy cơ cao nhất mắc các bệnh do vi sinh vật ký sinh trên thảo dược gây ra. Tác giả nhận thấy: Có 35,6% mẫu thảo dược có nhiễm nấm, 51,5% có nhiễm vi khuẩn, tổng số có 31,8% mẫu thảo dược có mức vượt ngưỡng an toàn ($> 10^5$ CFU/gram), có 31,5% mẫu thảo dược không đủ điều kiện bảo quản. Elisabeth Streit và CS (2012), thống kê và phân tích độc tố nấm trong 8 năm tại Châu Âu và Châu Á ở 17 316 mẫu đồ ăn và nguyên liệu thô với các chỉ số đánh giá aflatoxin, ochratoxin A, deoxynivalenol. Kết quả 72% mẫu thực phẩm (+) với 1 độc tố nấm, 38% nhiễm từ 2 loại độc tố nấm trở lên. Đặc biệt giai đoạn 2005

tỷ lệ nhiễm aflatoxin từ 32% đã tăng lên 71% năm 2011 [75]. Tại Đức S. Drusch (2003), đã phát hiện ra aflatoxin trong nước ép hoa quả và hoa quả sấy khô do trong quá trình bảo quản, vận chuyển...hoa quả bị nhiễm nấm [76]. Andre El Khoury và CS (2011), sử dụng kỹ thuật PCR-RFLP của vùng đệm (vùng giao gen *aflJ* và *aflR*), sau đó dùng enzyme phân cắt giới hạn (RFLPs) để nghiên cứu thành phần loài nấm gây nhiễm độc aflatoxin ở nho. Kết quả: Các sản phẩm sinh ra từ *A. flavus* chia thành 3 đoạn 362, 210 và 102 bp, trong khi chỉ có 1 vị trí giới hạn của ở *A. paraciticus* sinh ra 2 phân đoạn 363 và 311 bp. Dựa vào kết quả này đã định danh thành phần các loài nấm gây bệnh ở cây và lá nho [77].

1.2.5.2. Tại Châu Á và Châu Phi

Tuy có đi sau châu Âu và Bắc Mỹ nhưng nhiều nhà khoa học Ở châu Phi và châu Á đã có những công trình khoa học có giá trị, với những kỹ thuật nghiên cứu tiên tiến nghiên cứu về tình trạng nhiễm vi nấm trong thực phẩm cũng như vai trò của các độc tố của vi nấm với sức khỏe con người và cách phòng tránh [75], [78]. Tại Việt Nam đã ban hành danh mục thuốc đông dược được bảo hiểm và tiêu chuẩn an toàn với mần bệnh nấm và các loại thực phẩm chế biến sau thu hoạch [70], [71]. Tại châu Phi và châu Á, nhiễm độc tố nấm gây ra những thách thức nghiêm trọng về sức khỏe và kinh tế [79], [80].

- Xi - Chun Wang và CS (2016), đã sử dụng kỹ thuật sắc ký miễn dịch định lượng độc tố của vi nấm, thông qua định lượng phức hợp kháng nguyên – kháng thể đơn dòng kháng fumonisin B₁ cho độ nhạy rất cao, phát hiện nhanh ngũ cốc nhiễm fumonisin B₁ mà các dải phát hiện mắt thường không phát hiện được. Đây là xét nghiệm ưu việt và hữu ích [81].

- Hyang Sook Chun và CS (2006), nghiên cứu nguy cơ ô nhiễm các độc tố aflatoxin trong thực phẩm tại Hàn Quốc bằng kỹ thuật ELISA để sàng lọc, sau đó các mẫu (+) được sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

để định lượng độc tố [82].

- Muhammad Sajid và CS (2014), đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của các kit ELISA chẩn đoán nhanh thực phẩm nhiễm aflatoxin, ochratoxin và các độc tố nấm khác ở nhiều nghiên cứu khoa học. Ông đã có kết luận là kit chẩn đoán nhanh chỉ giúp nhà quản lý xác định định tính nhằm nâng cao hiệu quả quản lý an toàn vệ sinh thực phẩm, không có giá trị định lượng [83].

- Năm 2017, El Khoury A và CS đã sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao xác định *Alternaria* và các độc tố khác của nấm trong 220 hoa, quả sấy khô gồm nho, kỳ tử, mơ, chà là. Kết quả có 17 độc tố của nấm mốc như *Alternaria*, ochratoxin A, patulin, trichothecenes...kết quả xác định tỷ lệ mẫu nhiễm ít nhất 1 loại độc tố là 64,6%(142 mẫu), tỷ lệ mẫu nhiễm độc tố thấp nhất là mơ sấy khô 48,2%, cao nhất là kỳ tử 83,3%. Các nhà khoa học đã kết luận *Alternaria* là chất độc cơ bản trong các hoa quả sấy khô, ngoài ra có 31,4% số hoa quả sấy khô có nhiễm từ 2 đến 4 loại độc tố. Từ kết quả này các nhà khoa học đi đến khuyến cáo cần có tiêu chuẩn an toàn và giới hạn cho phép nồng độ *Alternaria* trong hoa quả sấy khô [84].

- Năm 2019, Keng –Wen Lien và CS nghiên cứu 1089 mẫu kẹo lạc, bơ lạc, lạc nhập khẩu vào Đài Loan bằng kỹ thuật sắc ký lỏng/khối phổ song song, kết quả các mẫu (+) với nấm đều có hàm lượng trung bình 2,40µg/kg aflatoxin B1, 0,41µg/kg aflatoxin B2, 0,19 µ/kg aflatoxin G1 và 0,03µg/kg aflatoxin G2 [85].

- Nhiều loài nấm sợi như *Aspergillus*, *Monnascus*, *Muscor*, *Penicillium*, *Rhizopus* và *Zymomonas* được sử dụng để lên men các sản phẩm sữa, đậu nành, tuy nhiên các loài nấm này cũng sản sinh các chất chuyển hóa có hại cho sức khỏe con người [86], [87], [88]. Năm 2022, các nhà khoa học tại Hàn Quốc đã xác định được sự có mặt của aflatoxin, alternariol, alternariol monomethyl ether, ochratoxin A, rhizocin, T-2 và zearalenone, fumonisins và độc tố T-2 và

zearalenone...có trong nguyên liệu thô và các sản phẩm trung gian, sản phẩm cuối cùng [7], [82]. Tại Việt Nam và Thế giới, có một số công trình nghiên cứu về tình trạng nhiễm nấm và các tác hại do nấm với sức khỏe con người như:

1.2.5.3. *Tại Việt Nam*

Tại Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về tình trạng nhiễm độc tố do nấm trong lương thực, thực phẩm và các chế phẩm nông nghiệp, kể các các nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyên sâu định lượng các chất độc do nấm ký sinh và chuyển hóa [89], [90].

- Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu 505 mẫu thuốc cỏ truyền tại các bệnh viện tỉnh Nghệ An cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm bằng nuôi cấy trong môi trường Saboraud 51,8%, trong đó thuốc bắc là 45,53%, thuốc nam 72,8%, tỷ lệ nấm sợi 92,0%. Bằng kỹ thuật sắc ký khí cho thấy lệ nhiễm aflatoxin chung là 4,75%(24/505). Trong 24 vị thuốc đông dược nhiễm aflatoxin có 66,66%(16/24) vượt tiêu chuẩn cho phép QCVN 8-1:2011/BYT [47].

- Phạm Thị Ngọc Lan (2012), khảo sát ô nhiễm thực phẩm trên địa bàn thành phố Huế, kết quả cho thấy: 11,1% mẫu nghiên cứu có ô nhiễm nấm, trong đó 13,6% mẫu kẹo, 19% mẫu tôm cá mực [90].

- Bùi Thị Mai Hương (2012), nghiên cứu ô nhiễm chất độc do vi nấm trong lương thực, kết quả: Tỷ lệ nhiễm aflatoxin B1 ở gạo vượt ngưỡng cho phép là 17,1%, tỷ lệ nhiễm fumonisin B1 vượt ngưỡng cho phép là 6,3%; Trong ngô tỷ lệ vượt ngưỡng cho phép của aflatoxin B1 là 28,1% và fumonisin B1 là 23,3%. Bằng cách tính toán lượng tiêu thụ gạo, ngô và sự tích lũy các chất độc aflatoxin B1 và fumonisin B1 tác giả đã đưa ra nguy cơ K gan ở hai xã Tả Phời và Hợp Thành: Với aflatoxin ở gạo là 7,5/100 000 dân, ngô 5,2/100 000 dân; Đối với fumonisin B1 do gạo là 727,1/100 000 dân, do ngô 37/100 000 dân, cả gạo và ngô 764,9/100 000 dân [13].

- Cùng tác giả Bùi Thị Mai Hương (2016), đã nghiên cứu tỷ lệ suất ăn

nhiễm độc tố aflatoxin B1, ochratoxin A và fumonisins B1 ở người trưởng thành tại Lào cai, Việt Nam, kết quả cho thấy: Với 1134 mẫu thực phẩm được chuẩn bị tại các gia đình thì tình trạng nhiễm aflatoxin B1 là 39,4 ng/kg/bw/ngày, ochratoxin 18,7ng/kg/bw/ngày. Tỷ lệ này cao hơn nhiều lần giá trị cho phép. Nguy cơ ung thư gan liên quan đến ăn thức ăn nhiễm aflatoxin là 2,7/100 000 trường hợp/năm [91].

- Lý Thu Hương (2012), nghiên cứu tình trạng nhiễm nấm và ochratoxin A trong đất và rễ cây trồng, kết quả cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus niger* và *Penicillium viridicatum* có khả năng sinh ochratoxin A là 43,75%, tỷ lệ nhiễm này thay đổi từ 11,1% đến 62,5%. Hàm lượng ochratoxin phân tích được ở các mẫu nhiễm *Aspergillus niger* từ 0,7 – 12 ppb, các mẫu nhiễm *Penicillium viridicatum* 0,5 đến 8 ppb [42].

- Phan Thị Kim Liên (2021), nghiên cứu tại Đồng bằng Sông Cửu long thấy gần 50%(91/184) mẫu thóc nhiễm aflatoxin, 20%(9/46) mẫu gạo nhiễm aflatoxin, trong đó có 3 mẫu thóc nhiễm aflatoxin vượt ngưỡng cho phép ($> 5\mu\text{g/kg}$), nhiễm aflatoxin phụ thuộc vào kiến thức, thực hành của người dân trong canh tác, chế biến, bảo quản và vận chuyển thóc gạo [68].

1.2.6. Cấu trúc phân tử, cơ chế sinh aflatoxin và gây độc của aflatoxin

1.2.6.1. Cấu trúc phân tử, cơ chế gây độc của aflatoxin

- **Cấu trúc phân tử:** Aflatoxin có 6 loại khác nhau riêng biệt bao gồm: B1; B2; G1; G2; M1 và M3, aflatoxin B1 là loại cực độc chỉ cần một lượng nhỏ 0,003 ppm từ lạc mốc có thể gây ra u gan [5], [58]. Sau aflatoxin là nhóm ochratoxin được phát hiện, có 4 loại ochratoxin được biết đến là: Ochratoxin A; Ochratoxin B; Ochratoxin C có 2 loại là: loại 1 là este etyl của ochratoxin A và loại 2 là este metyl của ochratoxin A).

Tất cả các ochratoxin đều có điểm nóng chảy $> 120^{\circ}\text{C}$ và rất bền ở nhiệt độ cao, vì vậy ochratoxin không bị phá hủy khi đun sôi ở điều kiện bình thường,

các thực phẩm, thuốc đông dược bị nhiễm vi nấm và đã có các sản phẩm là chất độc ochratoxin sinh ra do nấm thì không thể an toàn khi sử dụng ngay cả khi đun sôi kỹ [5], [6], [58].

Bảng 1.1 Một số tính chất hóa lý của aflatoxin [58]

Aflatoxin	Công thức phân tử	Trọng lượng phân tử
Aflatoxin B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312,30
Aflatoxin B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314,30
Aflatoxin G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3
Aflatoxin G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3
Aflatoxin M1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328,3
Aflatoxin M2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330,3

- Cơ chế gây độc của aflatoxin

Hiện nay chưa có công trình nghiên cứu nào về LD₅₀ của aflatoxin trên người nhưng các nghiên cứu trên động vật cho thấy: Thỏ 0,3 mg/kg, lợn 0,6mg/kg, mèo 0,55mg/kg, chó 0,5-1mg/kg, vượn châu phi 2,0mg/kg. Các loài nấm khi ký sinh sản sinh ra 18 độc tố thuộc nhóm mycotoxin, nguy hiểm nhất là aflatoxin B1 [45], [55]. Trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu:

- C. Dall Asta và P. Battilani (2016), thống kê, tổng hợp từ nhiều nghiên cứu về nấm và vai trò của các độc tố nấm nhất là các dạng biến thể của aflatoxin với sức khỏe con người [92].

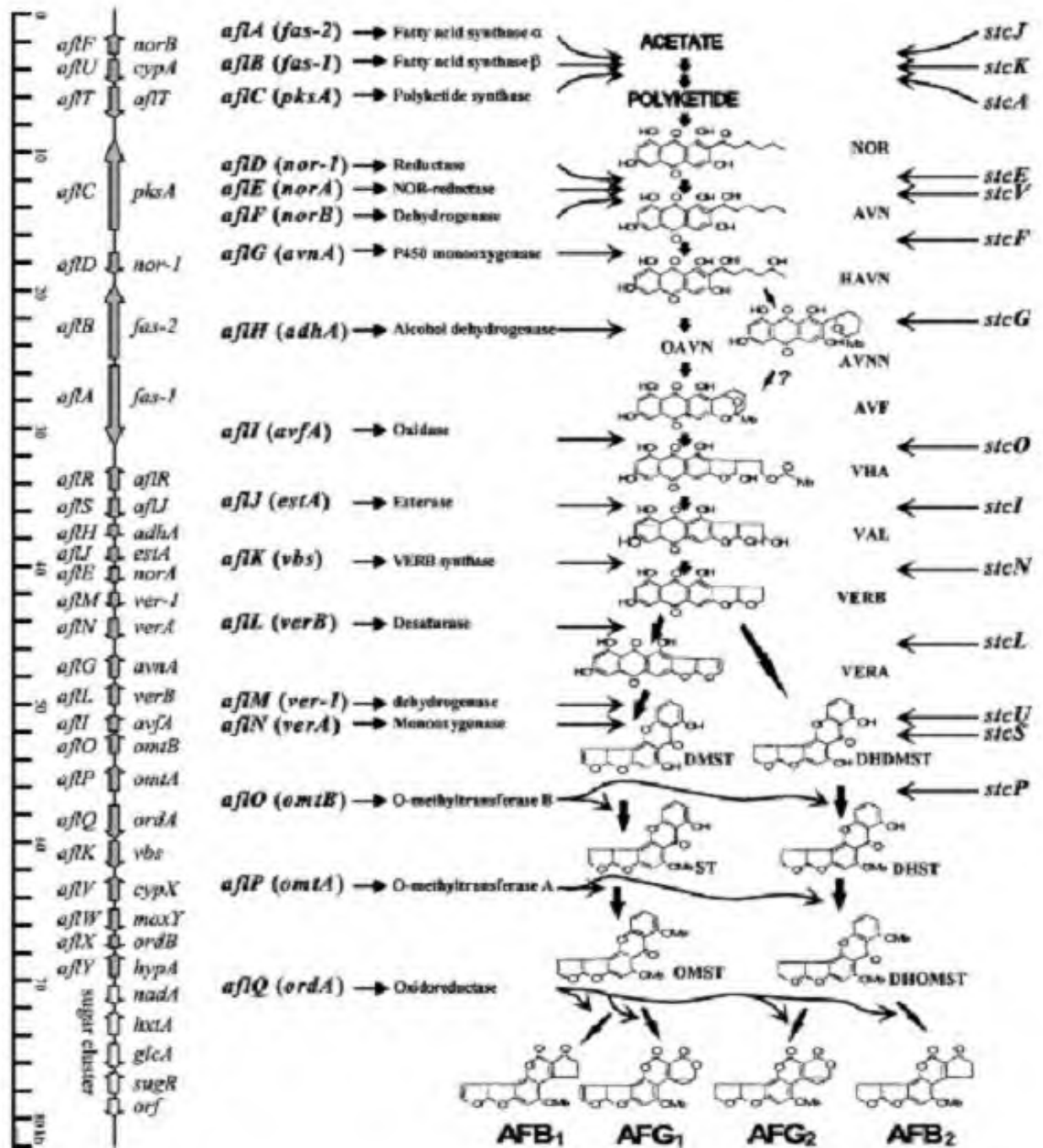
- Goksun Demirel (2015), nghiên cứu vai trò của aflatoxin và fumonisin B₁ (FB1) sinh ra do nấm *Fusarium verticillioides* có trong các nông sản mốc. Thông thường các FB1 tác động đến chuyển hóa sphingolipid với khởi đầu làm thay đổi cấu trúc phân tử làm bằng cách thay đổi quá trình methyl hóa ở thận và các tế bào gan, qua đó làm thay đổi ADN gây ra ung thư gan và thận. Ông đã sử dụng kết hợp giữa kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao với đầu dò quang phổ tử ngoại (HPLC-UV/ĐA) và methyl hóa chất hoạt hóa CpG bởi phản

ứng methyl hóa đặc hiệu trong các tế bào Clone 9 và NRK-52^E biểu mô gan, thận chuột để xác định nồng độ FB1 [93].

Vai trò của aflatoxin B1 và fumonisin B1 với sự hình thành quái thai, dị tật ở thai nhi và sảy thai ở phụ nữ đã được khẳng định. Hyang Sook Chun (2006), sử dụng kỹ thuật ELISA để sàng lọc, các mẫu (+) được sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để định lượng độc tố, kết quả: 109/694 mẫu nghiên cứu (+) bằng kỹ thuật ELISA thì có 32 mẫu nhiễm fumonisin B1, với hàm lượng $> 48,6 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$, có 28/32 mẫu trong giới hạn cho phép ($< 10 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$). Dựa trên lượng tiêu thụ hằng ngày tính ra lượng độc tố fumonisin B1 hấp thu vào mỗi người dân trung bình là $6,42 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\text{kg}^{-1} \text{bw}/\text{ngày}$. Nguy cơ ung thư gan là $5,78 \cdot 10^{-7} \mu\text{g}/\text{kg}^{-6} \text{bw}/\text{ngày}$ với người (-) với viêm gan B và $1,48 \cdot 10^{-4} \text{bw}/\text{kg}^{-1}/\text{ngày}$ với người (+) với viêm gan B [82].

1.2.6.2. Quá trình sinh độc tố aflatoxin của nấm

Trong quá trình ký sinh của nấm trên các vị thuốc cổ truyền, nấm sẽ sinh độc tố ở các điều kiện phù hợp, quá trình như hình 1.2 sau:



Hình 1.2. Cơ chế sinh tổng hợp aflatoxin [58]

Quá trình sinh độc tố aflatoxin theo trình tự 16 bước như sau:

- (1) NOR (norsolorinic acid); (2) AVN (averantin); (3) HAVN: 5'-hydroxyaverantin
- (4) AVNN (averufamin); (5) AVF (averufin); (6) VHA (vesiconal hemiacetal); (7) VAL (versiconal); (8) VERB (versicolorin B); (9) VERA (versicolorin A); (10) DMST

(demethylsterignatocystin); (11)DHDMST (dihydro demethylsterignatocystin); (12) ST (sterignatocystin); (13)DHST (dihydro sterignatocystin); (14)OMST, O-methylsterignatocystin; (15) DHOMST (dihydro-O-methylsterignatocystin); (16) 4 loại aflatoxin gồm: AFB_1 (aflatoxin B_1) + AFB_2 (aflatoxin B_2) + AFG_1 (aflatoxin G_1) + AFG_2 (aflatoxin G_2). Sản phẩm cuối cùng là 4 loại aflatoxin B1, B2, G1, G2, trong đó aflatoxin B1 là phổ biến nhất, chiếm 75% lượng độc tố sinh ra.

1.3. Các kỹ thuật xác định nhiễm nấm và aflatoxin

Để phát hiện nấm có nhiều kỹ thuật, các kỹ thuật được áp dụng: Kỹ thuật soi tươi; Nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud [18]; Kỹ thuật sinh học phân tử PCR và giải trình tự gen, kỹ thuật miễn dịch học xác định sự có mặt của nấm thông qua độc tố aflatoxin bằng các test chuẩn đoán nhanh [94].

1.3.1. Kỹ thuật xác định nhiễm nấm

1.3.1.1. Kỹ thuật soi tươi

Để chẩn đoán nhiễm nấm cho nhiều loại mẫu bệnh phẩm, thực phẩm thì kỹ thuật đơn giản nhất là soi tươi trong môi trường KOH20%, hoặc nước muối sinh lý [18], [95]. Soi lên vật kính 40, ta sẽ thấy sợi nấm hoặc nấm men ở hình dạng đặc trưng. Nếu là nấm *Aspergillus* spp với các đặc điểm sợi nấm ngắn, phân nhánh tạo góc 45° và có bào đài trong như bông hoa cúc.

Nhược điểm của phương pháp này là tỷ lệ phát hiện nấm thấp, dễ bỏ sót, thường áp dụng kết hợp với phương pháp nhuộm soi. Tuy nhiên, sử dụng kỹ thuật soi tươi, có thể đánh giá được tình trạng nhiễm vi nấm trong các vị thuốc cổ truyền và để chính xác hơn ta có thể sử dụng thêm các phương pháp nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud sau đó soi trên kính hiển vi sẽ cho hình ảnh đặc trưng của các loài nấm [3], [94], [95].

1.3.1.2. Kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud

Môi trường nuôi cấy các loài nấm thông dụng nhất là Saboraud, với các điều kiện pH = 5,5 (acide nhẹ) mục đích ức chế vi khuẩn phát triển, thông

thường khi nuôi cấy ta có thể sử dụng kết hợp với cloramphenicol và cycloheximind, để ở nhiệt độ phòng. Nếu về mùa đông sau 1 - 3 tuần nấm mọc. Môi trường Saboraud gồm các thành phần cơ bản sau [32], [96], [97]: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 5 gam. KH_2PO_4 : 1 gam; $\text{MgSO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$: 0,5 gam; Dịch chiết men: 0,05ml, thạch tinh khiết: 20 gam; Nước cất vừa đủ: 100 ml; Kháng sinh cloramphenicol và cycloheximind các loại khác. Sau khi nuôi cấy khuẩn lạc nấm mọc, dựa vào hình thể sợi nấm như cấu trúc sợi nấm, bào đài, đính bào đài, bào tử... để định danh loài. Cho đến nay, kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud vẫn là tiêu chuẩn vàng chẩn đoán nhiễm nấm.

1.3.1.3. Kỹ thuật sinh học phân tử PCR

Margit Hummel và CS (2004), đã sử dụng kỹ thuật PCR lồng để chẩn đoán *A. fumigatus* chủng ATCC 9197 xâm lấn ở chuột. Sau khi nuôi cấy 7 ngày trên môi trường thạch Sabouraud ở 37°C , sau đó rửa bằng dung dịch nước muối đẳng trương và hệ thống treo, lọc qua tế bào Becton Dickinson để tạo dịch huyền phù, tiếp theo pha loãng ở các nồng độ khác nhau và sử dụng kỹ thuật PCR để phát hiện nấm *A. fumigatus*. Ông thấy rằng ngưỡng phát hiện là 10^{-1} cfu ml⁻¹ cho máu, 1cfu ml^{-1} cho não, 5cfu ml^{-1} cho lá lách và đặc biệt là 10cfu ml^{-1} cho phổi và gan. Ông đã đi đến kết luận sử dụng kỹ thuật PCR lồng có thể phát hiện ADN của *A. fumigatus* ngay cả khi bệnh nhân ở tình trạng tái phát nấm thấp [35]. Kết luận của ông đã mở đường cho các nhà khoa học sau này sử dụng phương pháp PCR lồng để phát hiện ADN của *A. fumigatus* như: L.Klingspor (2006), Rosa de Lanos Frutos (2004), S.H. Mirhendi (2001), Loeffler và White .P.L (2006))...[31], [37].

Năm 2011, White.P.L, Carlo Mengoli và CS, Bretaq S và CS đã sử dụng kỹ thuật phân tích ADN của các ty thể nấm *Aspergillus* spp bằng cách kiểm soát nội bộ PCR, tức là PCR nhằm vào khu vực gen spacer sao chép và kiểm soát nội bộ ITS. Kết quả có 83% số mẫu được phát hiện được ít nhất 1 lần với khả năng

phát hiện 10 bộ gen/1 ml, độ nhạy 86,1%, độ đặc hiệu 93,6 %. Kết quả cho phép cùng một lúc phát hiện nhiều loài *Aspergillus* [37].

- *Với cặp môi ITS:*



Hình 1.3. Kết quả PCR (+) với *Aspergillus sp* và *Candida spp* [37]

[2: *A. fumigatus*; 3: *A. nidulans*; 4: *A. flavus*; 5: *A. terreus*; 6: *A. terreus* var. *terreus*; 7: *C. albicans*; 8: *C. tropicalis*; 9: *A. fumigatus*; 10: *R. oryzae*; 11: (-)]

Kết quả (+) ở 384 bp: ASP 5: (5'GAT AAC GAA CGA GAC CTC GG3'); ASP 8: (5'TGC CAA CTC CCC TGA GCC AG3'); ASP1: (5'CGG CCC TTA AAT AGC CCG GTC3'); ASP 7:(5'CCT GAG CCA GTC CGA AGG CC3').

- *Với cặp môi ITS₂*: Kết quả (+) ở 180 bp của *A. fumigatus*, trình tự các nucleotid như sau:

AF4: (5'GCGCACAAGTAGAGTGATC3');

AR1: (5'GCGTTCCTCGGTCCA3');

ASF1: (5'GCACGTGAAATTGTTGAAAGG3');

ADR1: (5'CAGGCTGGCCGCATTG3').



Hình 1.4. Kết quả xét nghiệm PCR (+) với *Aspergillus fumigatus* [31]

(5: *A. terreus*; 6: *A. terreus* var. *terreus*; 7: *C. albicans*; 8: *C. tropicalis*; 9: *A. fumigatus*; 10: *R. oryzae*; 11: Âm tính (negative control))

1.3.2. Một số bệnh ở người do nấm và độc tố nấm

1.3.2.1 Nhiễm độc cấp tính

Biểu hiện của nhiễm độc cấp do aflatoxin và ochratoxin, fumonisin B1 chủ yếu suy chức năng gan cấp như: Da xanh tái, đau tức hạ sườn phải, sờ thấy gan to nhất là gan phải, toàn trạng người bệnh mệt mỏi, rối loạn tiêu hóa như: Nôn, nôn khan, có thể hôn mê do phù não và dẫn đến tử vong. Khi mổ tử thi thấy nhu mô gan có màu trắng nhợt, có các vết hoại tử gan, chảy máu trong gan do tế bào gan bị phá hủy liên tục trong thời gian ngắn [5], [6].

1.3.2.2. Nhiễm độc mãn tính

Qua nhiều công trình nghiên cứu đã kết luận: Những người có nguy cơ cao thường xuyên tiếp xúc với nấm mốc và các yếu tố nguy cơ thuận lợi khác thì bệnh ung thư gan nguyên phát tăng cao. Cơ chế tác động của aflatoxin gây ung thư gan như thế nào cho đến nay còn nhiều điều tranh cãi, tuy nhiên các nhà khoa học đã tìm thấy sự gắn kết của aflatoxin với AND của tế bào gan ở người bệnh ung thư gan nguyên phát. Phức hợp aflatoxin với AND của người bệnh ung thư gan nguyên phát cũng được tìm thấy trong máu ngoại vi, trong nhau thai và dây rốn của sản phụ phơi nhiễm với aflatoxin [26], [98].

Các nhà khoa học đã xác định có liên quan giữa phơi nhiễm aflatoxin và ochratoxin với đột biến gen p53 ở bệnh nhân ung thư gan nguyên phát. Gen p53 có chức năng kiểm soát sự chết tế bào theo chương trình, đột biến gen này có thể làm cho tế bào gan chuyển thành ác tính, mất kiểm soát [62] [99]. Manish Adhikari và CS (2017), đã công bố kết quả của công trình nghiên cứu về vai trò của độc tố T-2 mycotoxin với quá trình ung thư hóa và gây quái thai, dị tật ở thai nhi. Độc tố T-2 mycotoxin này do nấm *fusarium* spp sinh ra trong quá trình ký sinh ở vật chủ. Từ T-2 mycotoxin có thể chuyển hóa thành 20 chất chuyển hóa khác nhau, trong đó có hydroxyl trichothecenes -2 là chất nguy hiểm nhất, có thể được hấp thu ở dạ dày, ruột, gan, thận, chúng tác động lên vật

chất di truyền và làm rối loạn vật chất di truyền gây ung thư hóa [100].

1.3.3. Các kỹ thuật xác định nhiễm aflatoxin

Hiện nay, trên thế giới có nhiều kỹ thuật hiện đại để xác định chính xác độc tố của vi nấm trong thực phẩm. Khi phát hiện có độc tố của nấm trong thực phẩm thì ta cũng kết luận là “*thực phẩm đã nhiễm nấm mốc*”, có nhiều nghiên cứu của các tác giả trên thế giới và Việt Nam như:

1.3.3.1. Kỹ thuật miễn dịch

- Anima J Sirma và CS (2015), nghiên cứu nhiễm aflatoxin do nấm trong ngũ cốc và kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống của nấm của người dân tại Kenya trong 408 mẫu thực phẩm từ các hộ gia đình bằng kỹ thuật ELISA, kết quả 77,9% mẫu ngô nhiễm aflatoxin từ 0,17 đến 5,3 ppb, 92,9% các mẫu kê nhiễm aflatoxin từ 0,14 – 6,4 ppb và 50% các mẫu lúa vượt tiêu chuẩn cho phép của quốc gia [72].

- Xi - Chun Wang và CS (2016), đã sử dụng kỹ thuật sắc ký miễn dịch bằng các que phát hiện gắn kháng thể vàng nano dạng keo để phát hiện nhanh độc tố aflatoxin và fumonisin B1 trong ngũ cốc. Mật độ màu sắc của que tương quan với nồng độ FB1 trong giới hạn 2-40 ng/mL, phạm vi tuyến tính đối với fumonisin B1 là 50 – 100 µg/kg, trong giới hạn bằng mắt thường chỉ phát hiện được từ 1000 µg/kg trở lên. Ông đã quan sát 24 mẫu ngũ cốc từ Hefei Trung Quốc và cho kết luận: Liên hợp kháng nguyên – kháng thể đơn dòng kháng fumonisin B1 kết hợp sắc ký khí, phát hiện nhanh ngũ cốc nhiễm fumonisin B1 mà các dải mắt thường không phát hiện được. Đây là xét nghiệm ưu việt và hữu ích [81]. Các nhà khoa học là sử dụng kit phát hiện nhanh độc tố, thông qua xác định có mặt độc tố cũng khẳng định mẫu lương thực, thuốc cổ truyền có nhiễm nấm mốc.

- Elif Burcu Bahadır (2016), đã thiết kế, sản xuất các que thử nhanh dựa trên nguyên lý kháng nguyên - kháng thể phát hiện aflatoxin và que thử “lai”

phát hiện DNA của nấm mốc [101], que thử có 4 phần (4 khu vực):

- + Khu vực 1. Chất đệm mẫu, là khu vực chứa mẫu;
- + Khu vực 2. Miếng đệm cộng hợp trên đó có dán nhãn để nhận biết và phát hiện các phân tử sinh học;
- + Khu vực 3. Màng phản ứng, trong đó chứa đường kiểm tra và đường đối chứng xác định phép “lai” ADN que thử ADN đây là nơi xảy ra phản ứng kháng nguyên - kháng thể và có chứa miếng đệm hấp thu nước;
- + Khu vực 4. Các hạt nano vàng LFAs là các hạt nano các bon, các chất lượng tử và gắn các enzyme được sử dụng để nhận biết và tăng độ nhạy của phản ứng. Các que thử nhanh này cho độ nhạy và độ đặc hiệu $\approx 100\%$, tuy nhiên, nếu định lượng aflatoxin thì còn nhiều hạn chế do có sai số lớn.

Trước đây các kit chẩn đoán nhanh bằng cơ chế miễn dịch xác định sự có mặt của vi nấm thông qua độc tố của nấm, tuy nhiên, chỉ phát hiện có tính chất định tính. Để khắc phục nhược điểm này các nhà khoa học đi sâu vào nghiên cứu sản xuất ra các loại kit chẩn đoán nhanh có thể chẩn đoán định tính và định lượng, điển hình là nghiên cứu của các nhà khoa học:

Ravikant Shekhar và CS (2025), sử dụng KIT chẩn đoán nhanh xác định tình trạng nhiễm nấm thông qua phát hiện độc tố của nấm ở 5 quốc gia với 4 vùng sinh thái tại Châu Phi, kết quả: 76% mẫu ngô, 64% mẫu kê, 60% mẫu lúa dương tính mới aflatoxin B1, trong đó 26% mẫu ngô, 10% mẫu kê, 11% mẫu lúa có hàm lượng aflatoxin B1 vượt ngưỡng cho phép theo tiêu chuẩn Kenya khuyến cáo sử dụng kỹ thuật ELISA (miễn dịch liên kết enzyme) cho kết quả nhanh, chính xác [102]. Ở nước ta cũng sử dụng test nhanh phát hiện độc tố của nấm là aflatoxin. Bộ test này đã trang bị cho tất cả các trung tâm an toàn vệ sinh thực phẩm của các tỉnh và là kỹ thuật thường quy bắt buộc.

1.3.3.2. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao và sắc ký khí hiệu năng cao

Đến nay, trên thế giới có nhiều công trình nghiên cứu ứng dụng các phương pháp và kỹ thuật xác định tình trạng nhiễm các độc tố của nấm như các

kỹ thuật miễn dịch [102], test nhanh, sắc ký khí, sắc ký khí lỏng hiệu năng cao được áp dụng. Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High performance liquid chromatography) là phương pháp chia tách, trong đó pha động là chất lỏng và pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một phần chất lỏng phủ lên một chất mang rắn, hoặc một chất mang đã được biến đổi bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Quá trình sắc ký lỏng dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion hay phân loại kích cỡ (rây phân tử) [103], [104], [105], nghiên cứu của các nhà khoa học:

- Sumet Ling và CS (2015), sử dụng kỹ thuật strip Test (fumonisin B1 – Keyhole limpet hemocyanin (FB1- KHL), đây là kỹ thuật miễn dịch vàng dạng keo phát hiện nhanh độc tố fumonisin B1, với ngưỡng phát hiện là 2,5 -10 ng/mL, kết quả xác định bằng mắt thường với ngưỡng 2,5ng/ml. Kỹ thuật này cho kết quả nhanh chóng, có độ nhạy, độ đặc hiệu cao sau 5 phút [106].

Các nhà khoa học có quan điểm thống nhất: Phương pháp phân tích độc tố aflatoxin, alternaria, argot alkaloid, ochratoxin, patulin, trichothecene... bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, tuy nhiên phương pháp sắc ký khí lỏng có gần đầu dò khối phổ là kỹ thuật ưu việt nhất, có độ chính xác cao nhất, cần phát triển áp dụng rộng rãi trên thế giới [105], [106], [107].

- Yuan-Kai Wang (2013), nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật xét nghiệm miễn dịch sắc ký xác định nhiễm zearaleone và fumonisin B1 một cách chính xác và nhanh chóng trong các mẫu ngô, lúa mì làm thức ăn cho gia súc [105].

Hiện nay tại Việt Nam có nhiều nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật cao để xác định ô nhiễm aflatoxin trong các sản phẩm nông nghiệp, thuốc cổ truyền. Mangan và CS (2027), hoàn thành xây dựng được quy trình kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao và xác định nhiễm aflatoxin B1 [108]. Nguyễn Thành Duy (2025), sử dụng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang (UPLC-FD) để phân tích đồng thời aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong thực phẩm.

Kết quả: Bột ốt có tỷ lệ nhiễm aflatoxin cao nhất 56,41%, tiếp đến là đậu phộng 23,08%, bắp hạt 20,51%, nho khô 0,0%, có liên quan tuyến tính ở ba mẫu ốt bột, đậu phộng, hạt bắp, với $R^2 = 0,994$. Mức độ phơi nhiễm aflatoxin trong khẩu phần ăn hằng ngày là 36,8 ca/100.000 với nam và 44,7 ca/100 000 với nữ [109]

1.4. Phòng nhiễm nấm và aflatoxin trong thuốc cổ truyền

1.4.1. Các biện pháp về pháp lý

Kiểm soát chặt chẽ việc sử dụng thực phẩm, không dùng thực phẩm ôi thiu, quá hạn hoặc bị nấm ...Giám sát chặt chẽ hàm lượng độc tố vi nấm nhất là aflatoxin B1, ochratoxin... trong thực phẩm, giám sát môi trường bảo quản thực phẩm [53]. Amanda Anater và CS (2016), đã tổng hợp tình hình ô nhiễm nấm trong ngành thủy sản trên toàn thế giới và đã cảnh báo tình trạng nghiêm trọng ô nhiễm aflatoxin B1, ochratoxin, ông đã khuyến cáo: Các quốc gia nên có bộ tiêu chuẩn giám sát hàm lượng độc tố aflatoxin, ochratoxin [99]. Hiện nay, tại Việt Nam đã có quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm: QCVN 8-1:2011/BYT. Trên thế giới nhiều nước cũng ban hành quy chuẩn quốc gia riêng để kiểm soát tốt hơn độc tố của vi nấm [110]. Thực hành tốt bảo quản thuốc, nguyên liệu làm thuốc đã được Bộ Y tế ban hành trong Thông tư số 36/2018/TT-BYT [16]

- Sử dụng thực phẩm thay thế an toàn: Các nhà khoa học Matthew Atonbiik Achaglinkame ở Ghana (2017), đã có nghiên cứu tổng hợp về tình hình nhiễm độc tố do nấm trong ngũ cốc dành cho trẻ sơ sinh và giải pháp thay thế. Kết quả đã cho thấy tình trạng nhiễm nấm là đáng báo động, các thực phẩm thay thế như rễ và củ khoai lang màu cam rất rễ bảo quản theo các kỹ thuật truyền thống và ít bị nấm, ngoài ra có giá trị dinh dưỡng cao có thể thay bột gạo, bột mì, sắn..[111].

- Nâng cao năng lực giám sát ô nhiễm aflatoxin: Năm 2019, Timothy J.

Herrman và CS nghiên cứu các biện pháp nâng cao chất lượng giám sát aflatoxin tại các trạm xay sát lương thực nhằm đưa ra biện pháp giảm thiểu ô nhiễm aflatoxin tại 15 nhà máy ngô tại Kenya nhằm bảo vệ sức khỏe cho 10 triệu dân Kenya. Kết quả sau 5 vòng thử nghiệm độc lập ở các nhà máy đều cho kết quả phát hiện nồng độ aflatoxin từ 5 μg đây là mức giới hạn an toàn tại Kenya. Tác giả đã có kết luận kỹ thuật giám sát aflatoxin có hiệu quả cao ngay cả khi áp dụng cho các tuyến cơ sở sản xuất [112].

- Giám sát chặt chẽ các sản phẩm lương thực, hạt, củ, quả nhập khẩu: Trên thế giới hiện nay bùng nổ giao thương qua các sản phẩm nông, lâm, thủy sản đáp ứng các nhu cầu tiêu dùng và sản xuất tại các quốc gia, một tỷ lệ không nhỏ các sản phẩm đó ô nhiễm aflatoxin. Năm 2019, Keng –Wen Lien và CS nghiên cứu 1089 mẫu kẹo lạc, bơ lạc, lạc...bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng/khối phổ song song, kết quả các mẫu (+) với nấm đều có hàm lượng trung bình 2,40 $\mu\text{g/kg}$ aflatoxin B1, 0,41 $\mu\text{g/kg}$ aflatoxin B2, 0,19 $\mu\text{g/kg}$ aflatoxin G1 và 0,03 $\mu\text{g/kg}$ aflatoxin G2 [85].

1.4.2. Các biện pháp kỹ thuật

Là sản phẩm khai thác trong tự nhiên và nông nghiệp vì vậy có nguy cơ bị nấm cao nếu chế biến và bảo quản không tốt. Vì vậy cần thực hiện:

- Tạo ra các điều kiện bất lợi nhất không cho nấm phát triển. Nhà kho chứa thuốc cỏ truyền cao ráo, có cửa sổ thông gió và lấy ánh sáng tốt, không dột, không ẩm ướt, xung quanh kho phải sạch không có bụi rậm và có rãnh thoát nước. Trong kho có giá kệ hoặc tủ gỗ để thuốc, có máy hút ẩm, máy điều hòa nhiệt độ, nhiệt kế đo độ ẩm, nhiệt độ... đảm bảo vi khí hậu: Nhiệt độ < 25°C, độ ẩm < 70%, tốc độ gió 0,5 – 1m/s. Các nhà khoa học Trung Quốc đã đề xuất một số biện pháp phòng tránh độc tố nấm khác như: Sử dụng giải độc tố bằng hóa chất trung hòa aflatoxin, tuy nhiên các giải độc tố không độc cho người và phải được cho phép của Bộ Y tế. Với nhiệt độ phân hủy rất cao 121°C

nên không dùng nhiệt độ cao mà sử dụng biện pháp hóa học khi sản phẩm sau thu hoạch có nhiễm aflatoxin [105], [106]. Tại Đức, các nhà khoa học đã phát hiện nước hoa quả ép nhiễm aflatoxin và đã khuyến cáo biện pháp đơn giản, rẻ tiền là tăng cường rửa sạch các sản phẩm hoa quả trước khi ép nhằm giảm thiểu nhiễm aflatoxin do nhiễm nấm [75]. Các nhà khoa học đã xác nhận có 18 loại *Aspergillus* có khả năng sinh độc tố aflatoxin trong đó vài trò nổi bật của *A. flavus* và *A. parassiticus*, các độc tố phổ biến nhất là B1, B2, G1 và G2. Nhiều quốc gia đã có chiến lược phòng chống nhiễm nấm cho các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch, chế biến, bảo quản và phân phối, các nhà khoa học khuyến cáo cần có tiêu chuẩn quốc gia, giới hạn tối đa cho phép tồn tại lượng aflatoxin. Tại Pakistan tiêu chuẩn tối từ 2 đến dưới 20 ppb, tùy loại sản phẩm và sử dụng hóa chất trừ sâu trong nông nghiệp cũng là một biện pháp hữu ích hạn chế nấm phát triển [113], [114].

- Kiểm soát chặt chẽ nguyên liệu chế biến đầu vào, phải đảm bảo sạch không hỏng mốc. Sao, tẩm đúng cách, các vị thuốc phải được đựng trong hộp kín có nắp xoáy hoặc túi bóng dày hút chân không. Các vị thuốc phải được ghi nhãn rõ ràng, tránh bóc nhầm lẫn. Mỗi túi hoặc hộp đựng thuốc cổ truyền phải có 01 túi nhỏ hút ẩm. Hằng ngày phải kiểm tra thuốc đông dược để phát hiện sớm dấu hiệu nhiễm nấm ở các vị thuốc.

- Ứng dụng các kỹ thuật phi nhiệt trong bảo quản lương thực, thực phẩm và thuốc cổ truyền như: Sử dụng quy trình áp suất cao, xử lý bằng ozone, tia UV ánh sáng xanh, sử dụng trường điện xung (PÊ), plasma khí quyển lạnh (CAP), sử dụng chùm electron, sử dụng siêu âm và hạt nano [114]. Xây dựng hệ thống tiêu chuẩn an toàn [115], xây dựng hệ thống thông tin kiểm soát an toàn thực phẩm. Xây dựng các phần mềm dữ liệu, thuật toán dự báo ô nhiễm nấm và các độc tố dựa trên sử dụng các phân tích dự báo dịch tễ học theo thời gian thực [53], [116], từ khi ký hợp đồng, thời gian vận chuyển, thời gian quá

cảnh trên các kho bãi, đến khi các sản phẩm chế biến giữa các nước nhất là kiểm soát tại các cửa khẩu, tuân thủ các quy định của AOAC và IARC về kiểm soát ô nhiễm aflatoxin [117], [118], [119]

1.4.3. Tình hình nghiên cứu về nấm và tác hại của nấm với thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An

Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An là bệnh viện loại I, có 1000 giường bệnh nội trú, bệnh viện thực hiện được tất cả các kỹ thuật y học cổ truyền kết hợp với y học hiện đại. Trang thiết bị của bệnh viện tương đối hiện đại như: Siêu âm, điện tim, điện cơ, chụp X-quang có độ phân giải cao, chụp cắt lớp, hằng năm Tại Bệnh viện thu dung hàng chục ngàn người bệnh vào điều trị nội trú và điều trị ngoại trú, với mặt bệnh đa dạng như: Đột quỵ não, liệt nửa người... Giai đoạn từ 2010 đến nay Bệnh viện ngày càng được xây dựng khang trang và trang bị máy móc hiện đại đáp ứng được yêu cầu của nhiệm vụ hạng I. Kho thuốc của bệnh viện thường xuyên có từ 170 đến 200 vị thuốc cổ truyền theo danh mục của bảo hiểm y tế chi trả. Kho thuốc y học cổ truyền được bổ sung các trang thiết bị bảo quản thuốc như: Máy hút ẩm, máy điều hòa nhiệt độ, nhiệt kế, ẩm kế... để tạo điều kiện vi khí hậu.

Tại Nghệ An năm 2018 Đậu Huy Hoàn, nghiên cứu 505 mẫu thuốc cổ truyền tại các bệnh viện tỉnh Nghệ An cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm bằng kỹ thuật nuôi cấy trong môi trường Saboraud 51,8%, trong đó các mẫu thuốc bắc là 45,53%, thuốc nam 72,8%, tỷ lệ nấm sợi 92,0%, có 8,0% nấm men. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin chung là 4,75%(24/505). Trong 24 vị thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin có 66,66%(16/24) vượt tiêu chuẩn Việt Nam cho phép (QCVN 8-1:2011/BYT) [47].

Chương 2: PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 1: *Xác định tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trong một số vị thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023*

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Thuốc cổ truyền là thuốc có thành phần từ một hoặc nhiều dược liệu phối ngũ theo lý luận của y học cổ truyền hoặc theo kinh nghiệm dân gian và được chế biến, bảo quản theo phương pháp y học cổ truyền, có dạng bào chế truyền thống hoặc hiện đại [3]. Thuốc cổ truyền gồm các vị thuốc của y học cổ truyền phương đông, trong đó có thuốc nam và thuốc bắc. Thuốc bắc là thuốc có nguồn gốc từ Trung Quốc. Thuốc nam là các vị thuốc sản xuất và chế biến tại Việt Nam.

- Tiêu chuẩn lựa chọn: Các mẫu thuốc cổ truyền có trong danh mục thuốc Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An tại thời điểm nghiên cứu [81].

- Các mẫu nuôi cấy nấm (+) phân lập được từ các vị thuốc cổ truyền .

2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

- **Điều tra cắt ngang:** Tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An.

- **Nuôi cấy nấm:** Tại labo vi sinh Bệnh viện Y học cổ truyền tỉnh Nghệ An, đạt an toàn sinh học cấp II.

- **Thực hiện kỹ thuật xác định loài nấm:** Labo kỹ thuật cao, bộ môn Ký sinh trùng và côn trùng Học viện Quân y .

2.1.3. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 1/2023 – tháng 12/2024

2.1.4. Thết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang [120]:

2.1.5. Cỡ mẫu, phương pháp chọn mẫu nghiên cứu

- Cỡ mẫu nghiên cứu:

Áp dụng công thức tính cỡ mẫu tối thiểu cho một tỷ lệ nhiễm nấm trong các vị thuốc cổ truyền [120]:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1 - p}{p \varepsilon^2}$$

Trong đó:

p: Là tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền, chọn $p = 0,51$ theo Đậu Huy Hoàn 2018 [47].

$Z_{1-\alpha/2}$: Hệ số tin cậy, ứng với độ tin cậy 95% thì $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$;

ε : Sai số tương đối mong muốn chọn $\varepsilon = 0,15$,

với các giá trị đã chọn, cỡ mẫu tính toán là 165, thực tế nghiên cứu ở 170 mẫu thuốc cổ truyền .

- Phương pháp chọn mẫu:

+ Chọn mẫu thuốc cổ truyền :

Căn cứ vào danh mục thuốc cổ truyền được bảo hiểm chi trả tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An, trong kho của Bệnh viện vào thời điểm hiện tại có 171 mẫu thuốc cổ truyền, trong đó có 81 mẫu thuốc nam, 90 mẫu thuốc bắc.

Với cỡ mẫu tính toán là 170 vào thời điểm lấy mẫu nghiên cứu có 1 vị thuốc nam không còn, vì vậy chúng tôi chọn toàn bộ số mẫu thuốc nam và thuốc bắc là 170.

+ Chọn mẫu thực hiện kỹ thuật PCR và giải trình tự gen:

Căn cứ vào các mẫu nấm (+) khi nuôi cấy trong môi trường Saboraud, thực hiện kỹ thuật PCR và giải trình tự gen với gen mồi là ITS1, ITS4, ITS5, và NL4 nhằm mục đích xác định tỷ lệ, thành phần loài nấm trong các mẫu thuốc cổ truyền.

2.1.6. Nội dung nghiên cứu

- Thực trạng nhiễm nấm trong các mẫu thuốc cổ truyền
- + Thu thập mẫu thuốc cổ truyền và các thông tin kèm theo (điều kiện vi khí hậu trong kho bảo quản và lưu giữ thuốc).
- + Tiến hành phân lập nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud từ các mẫu thuốc cổ truyền.
- + Xác định tỷ lệ nhiễm nấm; Xác định thành phần loài nấm từ các mẫu thuốc cổ truyền dựa vào phương pháp hình thái và sinh học phân tử.
- Phân tích, xác định các yếu tố liên quan tới nhiễm nấm.

2.1.7. Các biến số trong nghiên cứu

Bảng 2.1. Các biến số sử dụng trong nghiên cứu

Tên biến số	Định nghĩa biến số	Phân loại	Phương pháp thu thập
Nhiễm nấm/không nhiễm nấm	Có/không có nấm hoại sinh trên các mẫu thuốc đông dược	Nhi phân	Nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud có kháng sinh
Nhiễm 1 loài (đơn nhiễm) nấm bằng hình thái học	Loài nấm xác định bằng kỹ thuật hình thái học	Định danh	Xét nghiệm định loại bằng hình thái học
Nhiễm nhiều loài (đa nhiễm) nấm bằng kỹ thuật hình thái học	Số loài nấm xác định được bằng kỹ thuật hình thái học	Định danh	Xét nghiệm định loại bằng hình thái học
Nhiễm nhiều loài nấm (đa nhiễm) bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Số loài nấm xác định được bằng kỹ thuật PCR	Định danh	Xét nghiệm định danh bằng PCR
Nhiễm 1 loài nấm bằng kỹ thuật sinh học phân tử	Loài nấm xác định được bằng kỹ thuật PCR	Định danh	Xét nghiệm định danh bằng PCR

2.1.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.1.8.1. Kỹ thuật thu thập mẫu thuốc đông được

Tại bệnh viện căn cứ vào danh sách các mẫu thuốc cổ truyền có trong danh mục thuốc được bảo hiểm, chọn 170 mẫu thuốc cổ truyền. Mỗi mẫu thuốc lấy 10 gram cho vào 2 lớp túi bóng vuốt mép, ghi nhãn đầy đủ mã bệnh viện, mã mẫu thuốc, ngày giờ lấy mẫu....cho vào hộp xốp đựng riêng biệt. Sau đó các mẫu thuốc cổ truyền được chuyển về labo vi sinh, của Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An để thực hiện kỹ thuật phân lập nấm. Một mẫu khác sẽ được gửi ra cơ sở xét nghiệm độc tố.

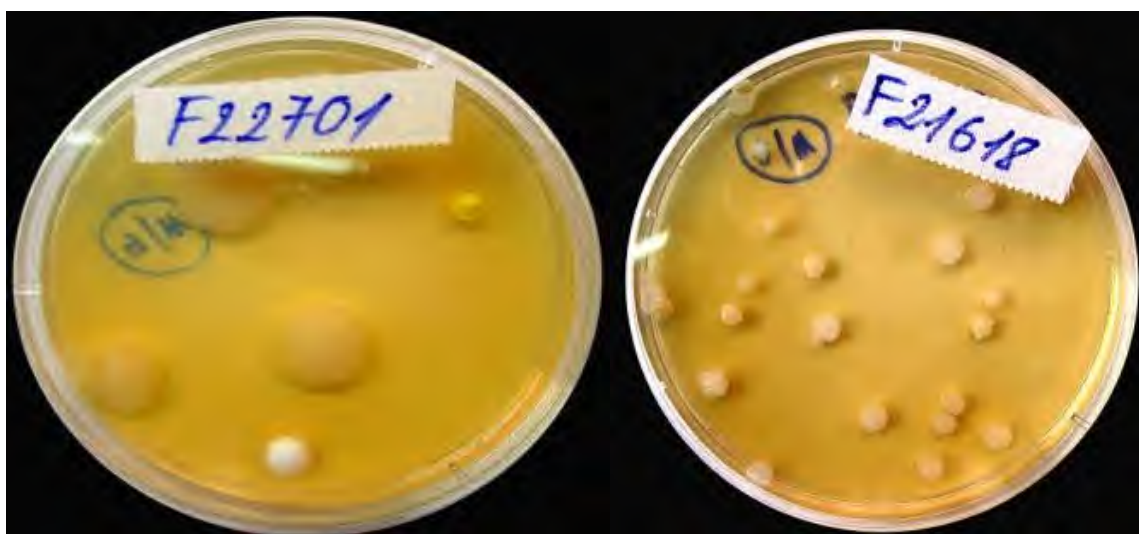
2.1.8.2. kỹ thuật phân lập nấm

- *Kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud :*

Kỹ thuật nuôi cấy trong môi trường Sabouraud có pH < 4,5, có kháng sinh, do hãng của hãng Merck (Đức) sản xuất. Môi trường Sabouraud sử dụng trong nghiên cứu này gồm các thành phần cơ bản sau [2]: (NH₄)₂ SO₄: 5 gam. KH₂PO₄: 1 gam; MgSO₄ + 2 H₂O: 0,5 gam; Kháng sinh Cloramphenicol và cycloheximind; Dịch chiết men: 0,05 ml, thạch tinh khiết: 20 gam, nước cất vừa đủ: 100 ml. Kỹ thuật nuôi cấy như sau:

Bước 1: Dùng panh hoặc kẹp gấp mẫu xét nghiệm di nhẹ một đường rích rắc trên bề mặt thạch dưới ngọn đèn cồn, sau đó bịt bằng nút bông, cho vào tủ ấm 37°C. Sau 24 - 48 giờ các khuẩn lạc nấm mọc có màu trắng trông mịn như nhung. Về mùa hè có thể không cần cho vào tủ ấm nấm vẫn có thể mọc nhanh chóng. Lưu ý khi nuôi cấy phải đảm bảo tuyệt đối vô trùng tránh xạ khuẩn.

Bước 2: Sau 3 - 5 tuần các khuẩn lạc nấm sử dụng hết dinh dưỡng trong môi trường, ta có thể cấy chuyển sang môi trường khác, hoặc lấy nhuộm soi, làm kỹ thuật PCR và giải trình tự gen để định loài.



Hình 2.1: Khuẩn lạc nấm mọc trong môi trường nuôi cấy [47]

2.1.8.3. Kỹ thuật nhuộm Methylene blue

Các mẫu nấm ở dạng sợi nấm, bào tử *Aspergillus* được nhuộm Methylene blue nhằm phân loại bằng hình thái học.

2.1.8.4. Kỹ thuật PCR

- Đối tượng thực hiện kỹ thuật:

Là bào tử hoặc sợi nấm nuôi cấy trên môi trường Sabouraud có pH acid và kháng sinh.

- Vật liệu nghiên cứu

+ *Dụng cụ*: máy PCR (Thermoscientific, Mỹ), máy ly tâm lạnh 5424R (Eppendorf, Đức), máy soi và chụp gel UVP (Canada), bộ điện di...

+ *Sinh phẩm hóa chất*: Môi trường Sabouraud, dung dịch NaCl 0.9%, dung dịch mực tàu, bộ kit tách chiết ADN Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit của hãng Norgen (Cat. # 27300, Norgen Biotek Corp), master mix 2X (Promega), gel agarose (Serva), dung dịch TBE 0.5% (Serva), và các hóa chất cần thiết khác...

+ *Cặp mồi cho phản ứng PCR*: Mồi xuôi ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') vào mồi ngược NL4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G -3') đã được chọn cho phản ứng PCR và giải trình tự dựa theo công bố của Irobi J. và CS (1999).

- Phương pháp tiến hành

+ Tách, đo nồng độ ADN và chạy phản ứng PCR

Tách ADN của nấm

Chuẩn bị mẫu: Lấy khuẩn lạc của nấm hòa vào dung dịch nước muối sinh lý trong tube eppendorf 1,5ml.

Dung dịch chứa nấm này được dùng để để tách chiết ADN.

Tiến hành tách ADN: ADN của vi nấm được tách chiết bằng bộ sinh phẩm Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit của hãng Norgen (Cat. # 27300, Norgen Biotek Corp). Quy trình tách chiết gồm 11 bước như sau:

Bước 1: Thêm 500µl nước cất vào 1 ống eppendorf 1.5 ml. Dùng que cấy lấy 1 ít khuẩn lạc nấm rồi hòa tan vào ống nước cất. Ly tâm 14,000 rpm trong 1 phút, giữ cạn, loại bỏ dịch nổi.

Bước 2: Thêm 250µl Resuspension Solution A, vortex nhẹ. Thêm 20µl enzyme Lyticase, ủ 30°C trong 45 phút. Thường xuyên lắc trong quá trình ủ.

Bước 3: Thêm 500 µl Lysis Buffer L và 5 µl RNase A vào tube rồi vortex để hòa tan.

Bước 4: Chuyển hỗn hợp vào ống Bead Tube, tiến hành vortex ở tốc độ tối đa trong 5 phút.

Bước 5: Đưa ống Bead Tube vào bể ổn nhiệt và ủ ở 65°C trong 10 phút, lắc 2 – 3 lần trong quá trình ủ.

Bước 6: Ly tâm nhẹ ống Bead tube sau đó chuyển tất cả dung dịch nổi phía trên bao gồm cả các tế bào vào ống eppendorf. (Không được lấy các hạt trong Bead Tube).

Bước 7: Ly tâm 14,000 rpm/2 phút, chuyển dịch nổi sang ống mới.

Bước 8: Thêm một lượng cồn bằng với lượng dịch nổi vừa hút, trộn đều. Sau đó tiếp tục thêm 300 µl Solution BX và trộn đều bằng máy vortex.

Bước 9: Hút 650 µl hỗn hợp vào cột lọc, ly tâm 10,000 rpm/1 phút, bỏ dịch phía dưới. Sử dụng ống cũ, thực hiện như trên với phần hỗn hợp còn lại.

Bước 10: Thêm 500 µl Wash Solution A vào cột lọc. Ly tâm 10,000 rpm trong 1 phút. Bỏ dịch phía dưới, sử dụng ống cũ. Lặp lại bước trên, sau đó ly tâm 14,000 rpm trong 2 phút và loại bỏ phần dịch phía dưới.

Bước 11: Chuyển cột lọc vào một ống Elution 1.7 ml. Thêm 100 µl Elution Buffer B, ly tâm 10,000 vòng trong 2 phút. Nếu không thu được toàn bộ thể tích thì ly tâm thêm 1 phút nữa.

Thu dung dịch ADN, ký hiệu và kiểm tra nồng độ ADN thu được.

- **Đo nồng độ AND:** Dung dịch ADN thu được được đo nồng độ trên máy NanoDrop 2000 tại Bộ môn Ký sinh trùng – Học viện Quân y.

- **Chạy phản ứng PCR:** DNA của nấm sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn (template) cho phản ứng PCR. Cặp mồi ITS5 và NL4 khuếch đại đoạn gen chứa 1 phần gen 18S rDNA; toàn bộ đoạn gen 5.8S rDNA; toàn bộ các đoạn giao gen ITS1, ITS2 và một phần gen 28S rDNA của vi nấm, kích thước khoảng 1000-1200bp, tùy loài nấm. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 50µl chứa các thành phần như sau: 25µl master mix 2X, 1 µl mỗi mồi loại (nồng độ cuối cùng 0,2µM), 5µl DNA của nấm và nước cất vừa đủ. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR: 95 °C trong 3 phút, 55 °C trong 30 giây, 72 °C trong 60 giây, tiếp theo 40 chu kỳ 95 °C trong 30 giây, 55 oC trong 30 giây, 72°C trong 60 giây và 72 °C trong 10 phút. 10µl sản phẩm phản ứng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1.5%. Phần sản phẩm PCR còn lại được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR Purification Kit (Cat. # K0701, Thermo) theo hướng dẫn của nhà sản xuất trước khi giải trình tự.

- **Kiểm tra sản phẩm PCR:** Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên thạch Agarose 2% trong môi trường đệm TBE 0.5X với thời gian 45 phút ở điện thế 100V.

Quy trình: Gel agarose 2% trong TBE 0.5X: hòa tan 2g agarose trong 100ml TBE 0.5X, đun sôi trong lò vi sóng cho agarose hòa tan hoàn toàn. Để

nguội xuống khoảng 60⁰C đến 65⁰C, đổ vào khay gel điện di có cài sẵn các răng lược thích hợp. Sau 30 - 60 phút, khi gel đã đông cứng, đặt vào bể điện di, đổ đệm TBE 0.5X ngập cách mặt gel từ 1-2 mm, gỡ lược ra. Tra mẫu: mỗi giếng tra 2.5µl sản phẩm PCR (đã pha với Loading dye).

Chạy điện di: tiến hành điện di với dòng điện một chiều có hiệu điện thế là 100V, cường độ dòng điện 100mA trong thời gian khoảng 1 giờ 30 phút.

Nhuộm ADN bằng EtBr: bản gel được lấy ra khỏi khay và ngâm trong dung dịch EtBr 10 µg/ml trong 10 phút, rửa sạch bản gel bằng nước cất.

Đánh giá kết quả dựa trên thang ADN chuẩn (100bp) của hãng Cleaver.

2.1.8.4. Kỹ thuật giải trình tự gen và xác định loài nấm

- Tinh sạch sản phẩm PCR chuẩn bị cho giải trình tự:

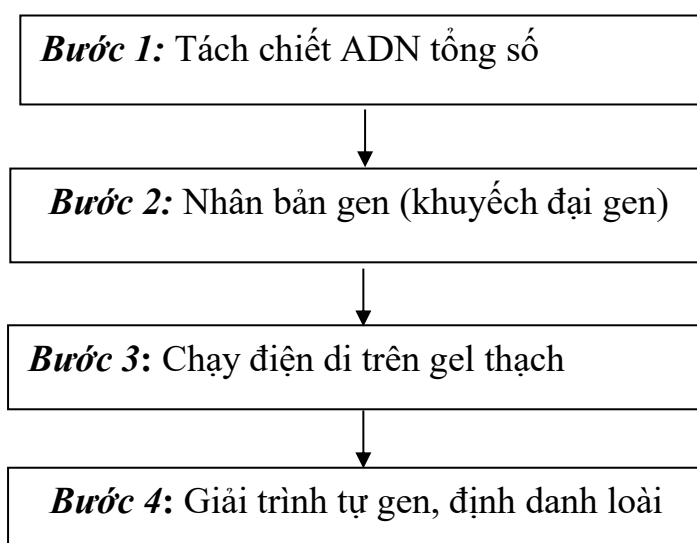
Phần sản phẩm PCR còn lại được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm GeneJET PCR Purification Kit (Cat. # K0701, Thermo) theo hướng dẫn của nhà sản xuất trước khi giải trình tự.

- Giải trình tự:

Sản phẩm PCR của các mẫu có 1 band duy nhất, rõ nét kích thước như lý thuyết (1000-1200bp) được gửi tới hãng First BASE Laboratories Sdn Bhdservice (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để giải trình tự trực tiếp với 2 môi ITS5 và NL4.

- Phân tích xác định loài dựa vào trình tự gen thu được

Trình tch xác định loài dựa vào trình tự gen thu được như lý thuyết (1000-1200bp) được gửi tới hãng First BASE Laboratories Sdn Bhdservice (Kembangan 43300, Selangor, M<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.9



Hình 2.2. Tóm tắt các bước thực hiện kỹ thuật PCR

2.1.9. Các chỉ số nghiên cứu

Các chỉ số đánh giá gồm: Kết quả nuôi cấy trong môi trường Sabouraud. Kết quả thực hiện kỹ thuật PCR định danh loài nấm. Tỷ lệ nhiễm nấm chung, tỷ lệ nhiễm nấm từng loại nấm, tỷ lệ nhiễm từng loài nấm, tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền như sau:

$$\text{Tỷ lệ nhiễm nấm chung của các mẫu thuốc (\%)} = \frac{\text{Số mẫu xét nghiệm (+) với nấm}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ nhiễm từng loài nấm của các mẫu thuốc trong mẫu nghiên cứu (\%)} = \frac{\text{Số mẫu xét nghiệm (+) với từng từng loài nấm của các vị thuốc cổ truyền}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

- Tỷ lệ nhiễm từng loại nấm bằng phương pháp sinh học phân tử PCR và giải trình tự gen

$$\text{Tỷ lệ, thành phần loài nấm trong các mẫu thuốc cổ truyền (\%)} = \frac{\text{Số mẫu xét nghiệm (+) từng loài nấm trong mẫu thuốc cổ truyền}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\frac{\text{Tỷ lệ từng loài nấm } Aspergillus \text{ spp trong các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm giống } Aspergillus (\%)}{\text{Số mẫu thuốc cổ truyền nhiễm } Aspergillus \text{ của từng loài nấm}} = \frac{\text{Aspergillus của từng loài nấm}}{\text{Tổng số mẫu thuộc giống nấm } Aspergillus} \times 100$$

2.2. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 2: *Phân tích tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các độc tố aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An, năm 2023*

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu thuốc cổ truyền thu thập được

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

- Khoa xét nghiệm tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An.
- Viện Kiểm nghiệm thuốc Quốc gia.

2.2.3. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 1/2023 – 12/2024.

2.2.4. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả thực nghiệm tại phòng thí nghiệm [120]

2.2.5. Cỡ mẫu nghiên cứu

Toàn bộ các mẫu thuốc cổ truyền thu được ở mục tiêu 1.

2.2.6. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu xác định tỷ lệ các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, từ đó xác định tỷ lệ các mẫu (+) với aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT [110] cho phép.

2.2.7. Các biến số trong nghiên cứu

Các biến số mục tiêu 2 như bảng 2.2 sau:

Bảng 2.2. Các biến số, chỉ số sử dụng trong nghiên cứu

Tên biến số	Định nghĩa/ Chỉ số	Phân loại	Phương pháp thu thập
Nhiễm aflatoxin (có/không nhiễm)	Số mẫu thuốc cổ truyền có nhiễm aflatoxin	Nhị phân	Xét nghiệm
Nhiễm loại aflatoxin	Loại aflatoxin nhiễm (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)	Định danh	Xét nghiệm
Nhiễm 1, 2, 3 loại aflatoxin	Mẫu thuốc nhiễm 1,2,3, và 4 loại aflatoxin	Định lượng	Xét nghiệm
Nhiễm aflatoxin từ 0,5 ppb – < 20 ppb/gram (%)	Mẫu thuốc cổ truyền có hàm lượng aflatoxin từ 0,5ppb - < 20 ppb/gram	Định lượng	Xét nghiệm
Mẫu thuốc đông dược nhiễm aflatoxin > 20 ppb/gram	Mẫu thuốc cổ truyền có hàm lượng aflatoxin > 20 ppb/gram	Định lượng	Xét nghiệm
Nhiễm từng loại aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 vượt tiêu chuẩn cho phép	Mẫu xét nghiệm có hàm lượng từng loại aflatoxin vượt tiêu chuẩn cho phép	Định lượng	Xét nghiệm

2.2.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.2.8.1. Vật liệu nghiên cứu

- Dụng cụ lấy mẫu xét nghiệm: Panh, kéo, túi bóng vuốt mép vô khuẩn, kính hiển vi, lam kính, la men, tủ sấy, tủ lạnh và các hóa chất cần thiết khác.
- Máy sắc ký khí lỏng hiệu năng cao HPLC.
- Methanol, acetonitril, toluen, nước, pyridinium hydrobromid perbromid tinh khiết sắc ký.

- Các phần mềm xử lý thống kê y – sinh học.

2.2.8.2. Quy trình định hàm lượng aflatoxin (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)

Trên thế giới kỹ thuật ELISA áp dụng rộng rãi như tại Mỹ và Canada. Tuy nhiên kỹ thuật ELISA chỉ có kết quả định tính, không cho phép chúng ta định được nồng độ aflatoxin, vì vậy trong đề tài này chúng tôi sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (AOAC Official Method 990.33) [116].

Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC (High performance liquid chromatography) là phương pháp chia tách, trong đó pha động là chất lỏng và pha tĩnh chứa trong cột là chất rắn đã được phân chia dưới dạng tiểu phân hoặc một phần chất lỏng phủ lên một chất mang rắn hay một chất mang đã được biến đổi bằng liên kết hóa học với các nhóm chức hữu cơ. Quá trình sắc ký lỏng dựa trên cơ chế hấp phụ, phân bố, trao đổi ion hay phân loại theo kích cỡ (Rây phân tử).

Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao định lượng aflatoxin như sau:

- Chuẩn bị các điều kiện sắc ký

+ Cột sắc ký RP 18 (25 cm × 4,6 mm x 5 µm)

+ Pha động: acetonitril - methanol - nước (150 : 280: 600)

+ Tốc độ dòng: 1 ml/min

+ Detector bước sóng kích thích 365 nm và bước sóng phát xạ 435 nm

+ Thể tích tiêm: 10 µl

+ Nhiệt độ cột: 35°C

Dẫn xuất hóa sau cột bằng pyridinium hydrobromid perbromid (PBPB)

+ Thuốc thử dẫn xuất hóa sau cột: Hòa tan 50 mg pyridinium hydrobromid perbromid (TT) trong 1000 ml nước (bảo quản tránh ánh sáng và dùng trong 4 ngày);

- Chuẩn bị các dung dịch

+ Dung dịch chuẩn: Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc, pha dãy 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp có chứa aflatoxin (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) với nồng độ từ 0,05 ppb

– 0,5 ppb trong methanol 30%.

+ Dung dịch thử: Dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch chứa kháng thể đối với aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂). Giữ cột sắc ký ái lực miễn dịch ở nhiệt độ phòng.

2.2.8.3. Các bước thực hiện kỹ thuật

- Lấy 5,00 g dược liệu đã tán bột (qua rây số 500), thêm 100,0 ml dung dịch methanol 70%, chiết bằng siêu âm trong 30 min.

- Lọc dịch chiết qua giấy lọc.

- Hút 10,0 ml dịch lọc trong cho vào một bình nón cỡ 150 ml.

- Thêm 70,0 ml nước, lắc đều.

- Hút 40,0 ml dung dịch cho chảy qua cột sắc ký ái lực miễn dịch với tốc độ 3 ml/min (không vượt quá 5 ml/min).

- Rửa cột bằng nước 2 lần, mỗi lần 10 ml với tốc độ không quá 5 ml/min rồi làm khô bằng cách áp một chân không nhẹ trong 5 đến 10 s, hoặc bằng cách dùng bơm tiêm thổi không khí qua cột sắc ký trong 10 s.

- Cho 0,5 ml methanol (TT) lên cột và để chảy qua cột nhờ trọng lực.

- Thu dịch rửa giải vào một bình định mức cỡ 5 ml. Sau 1 min, lại cho tiếp 0,5 ml methanol (TT) và hứng lấy dịch rửa giải lần 2.

- Chờ 1 min sau lại thực hiện lần rửa giải thứ 3 nữa cũng với 0,5 ml methanol (TT).

- Thu tối đa dịch rửa giải bằng cách nén không khí hoặc tạo một chân không nhẹ qua cột.

- Thêm nước vào bình định mức cho đủ 5 ml, lắc đều.

- Nếu thu được dung dịch trong thì có thể dùng ngay để phân tích.

- Nếu dung dịch không trong suốt thì cần lọc trước khi tiêm sắc ký. Dùng màng lọc sẵn dùng 1 lần (màng lọc polytetrafluoroethylen cỡ lỗ lọc 0,45 µm) đã được chứng minh là không gây mất aflatoxin do lưu giữ.

2.2.8.4. Tính kết quả

- Thiết lập phương trình đường chuẩn $y = ax + b$ với nồng độ aflatoxin

$B_1/B_2/G_1/G_2$ (ng/ml) trên trục x và tín hiệu đáp ứng (S) trên trục y.

- Nồng độ aflatoxin B_1 , aflatoxin B_2 , aflatoxin G_1 và aflatoxin G_2 (C) trong dung dịch đo được tính bằng biểu thức:

$$C \text{ (ng/ml)} = \frac{S - b}{a}$$

- Tính hàm lượng aflatoxin aflatoxin B_1 , aflatoxin B_2 , aflatoxin G_1 , aflatoxin G_2 trong dược liệu, biểu thị bằng ng/g, theo công thức sau:

$$X \text{ (ng/g)} = \frac{V1 \times V2 \times C}{m \times Vi}$$

Trong đó:

m là khối lượng dược liệu lấy để phân tích (g). V1 là thể tích dung môi được dùng để chiết (ml);

Vi là thể tích dịch chiết làm sạch bằng cột sắc ký ái lực miễn dịch (ml).

V2 là thể tích dung dịch cuối cùng sau khi rửa giải từ cột sắc ký ái lực miễn dịch và pha loãng (ml).

C là nồng độ aflatoxin đo được từ dung dịch thử (ng/ml).

Lưu ý:

- Các aflatoxin là những chất rất độc. Cần thực hiện các thao tác trong tủ hút hơi độc bất cứ khi nào. Phải đặc biệt lưu ý khi các độc tố này ở dạng bột, khô vì chúng có tính chất hút tĩnh điện và khuynh hướng phát tán vào môi trường làm việc; Trong trường hợp này nếu có thể thì thao tác trong hộp kín có gắng tay. Cần tuân thủ Quy trình khử nhiễm aflatoxin cho các chất thải phòng thí nghiệm được Cơ quan nghiên cứu ung thư quốc tế (IARC) xây dựng [119].

- Các aflatoxin bị ánh sáng phân hủy, cần tiến hành định lượng trong khu vực tránh ánh sáng ban ngày bằng cách dùng lá chắn tia tử ngoại trên cửa sổ kết hợp với ánh sáng dịu.

+ Tráng rửa dụng cụ thủy tinh trước khi dùng bằng dung dịch H_2SO_4 10% theo thể tích, rửa bằng nước cất cho đến khi không còn vết acid.

+ Các mẫu xét nghiệm ở điều kiện bình thường khi không nhiễm nấm thì hàm lượng aflatoxin là 0 ppb/gram, khi có hàm lượng > 0 ppb/gram là có nhiễm aflatoxin, 20 ppb/gram là giới hạn tối đa sức con người có thể chịu đựng, khi > 20 ppb là quá giới hạn cho phép. Vì vậy, các mẫu xét nghiệm có hàm lượng aflatoxin > 20 ppb/gram là ô nhiễm độc tố aflatoxin ở mức gây ngộ độc cấp < 20 ppb/gram là ngưỡng gây nhiễm độc mãn tính.

- **Đánh giá kết quả:** Đánh giá tình trạng nhiễm aflatoxin B1 theo tiêu chuẩn QCVN 8-1: 2011/BYT [110], cụ thể như sau:

Bảng 2.3. Giới hạn ô nhiễm aflatoxin trong một số thực phẩm theo tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT [110]

Tên thực phẩm	Tiêu chuẩn đánh giá ml(μ g/kg)	
	aflatoxin B1	aflatoxin tổng số
Lạc và các loại hạt có dầu		
- Phải sơ chế trước khi sử dụng	8	15
- Sử dụng trực tiếp	2	4
Hạt almonds, hạt dẻ cười, hạt mơ....		
- Phải sơ chế trước khi sử dụng	12	15
- Sử dụng trực tiếp	8	10
Hạt hazelnuts		
- Phải sơ chế trước khi sử dụng	12	15
- Sử dụng trực tiếp	8	10
Các loại hạnh nhân		
- Phải sơ chế trước khi sử dụng	8	15
- Sử dụng trực tiếp	5	10
Ngô, gạo phải sơ chế trước khi sử dụng	5	10
Các loại gia vị	5	10
Thực phẩm chế biến từ ngũ cốc	0,1	1

2.2.9. Các chỉ số nghiên cứu

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ nhiễm aflatoxin} \\ \text{chung của các mẫu} \\ \text{thuốc cổ truyền (\%)} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{Số mẫu xét nghiệm có hàm lượng} \\ \text{aflatoxin} > 0 \text{ (ppb/gram)} \end{array}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ mẫu xét nghiệm có} \\ \text{hàm lượng aflatoxin} \\ > 0,5 \text{ ppb/gram (\%)} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{Số mẫu có hàm lượng} \\ \text{aflatoxin} > 0,5 \text{ ppb/gram} \end{array}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ mẫu xét nghiệm có} \\ \text{hàm lượng aflatoxin từ} \\ 0,5 - 20 \text{ ppb/gram (\%)} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{Số mẫu có hàm lượng} \\ \text{aflatoxin từ } 0,5 - 20 \text{ ppb/gram} \end{array}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ mẫu xét nghiệm có} \\ \text{hàm lượng aflatoxin} \\ > 20 \text{ ppb/gram (\%)} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{Số mẫu có hàm lượng} \\ \text{aflatoxin} > 20 \text{ ppb/gram} \end{array}}{\text{Tổng số mẫu xét nghiệm}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Hàm lượng aflatoxin} \\ \text{trung bình ở các mẫu} \\ \text{thuốc cổ truyền có nhiễm} \\ \text{aflatoxin} \end{array} = \frac{\begin{array}{l} \text{Tổng lượng aflatoxin của} \\ \text{các mẫu xét nghiệm có} \\ \text{nhiễm aflatoxin} \end{array}}{\begin{array}{l} \text{Tổng số mẫu xét nghiệm} \\ \text{có aflatoxin} \end{array}} \pm \text{SD (ppb/gram)}$$

2.3. Phương pháp nghiên cứu mục tiêu 3: Đánh giá kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền

2.3.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu về tỷ lệ nhiễm nấm sau can thiệp (như mục tiêu 1).

2.3.2. Địa điểm nghiên cứu

Tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An.

2.3.3. Thời gian nghiên cứu

Từ tháng 1/2024 – tháng 12/2024

2.3.4. Thết kế nghiên cứu

Đề tài được thiết kế bằng phương pháp nghiên cứu can thiệp đánh giá trước can thiệp – sau can thiệp.

2.3.5. Cỡ mẫu, phương pháp chọn mẫu nghiên cứu

- Cỡ mẫu nghiên cứu:

+ Nghiên cứu can thiệp được thực hiện tại 02 nhà kho bảo quản thuốc của Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An

+ Cỡ mẫu được lựa chọn tương tự như nghiên cứu mô tả ban đầu (MT1), đảm bảo đủ số lượng mẫu để so sánh sự thay đổi tỷ lệ nhiễm nấm trước và sau can thiệp. Tổng số 170 mẫu thuốc cổ truyền được thu thập và phân tích trong nghiên cứu.

- Phương pháp chọn mẫu:

+ Chọn toàn bộ 2 nhà kho bảo quản thuốc cổ truyền

+ Chọn mẫu thuốc cổ truyền:

Chọn toàn bộ các vị thuốc cổ truyền từ danh mục các vị thuốc cổ truyền đang sử dụng tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An trong thời gian nghiên cứu (có 170 mẫu thuốc cổ truyền, trong đó có 81 mẫu thuốc nam, 89 mẫu thuốc bắc).

Tại Bệnh viện có 2 kho thuốc, một kho thuốc nam, 1 kho thuốc bắc, mỗi kho có 4 kệ để thuốc, trên mỗi kệ có nhiều ngăn chứa hộp đựng thuốc, có dán nhãn tên vị thuốc. Trong mỗi hộp, khi lấy mẫu sẽ lấy ở giữa hộp đựng thuốc. Lấy khoảng 10 gam cho vào 2 túi giấy bóng vuốt mép mỗi túi 5 gam, ghi rõ tên vị thuốc, ngày giờ lấy mẫu, lô thuốc, mã số túi đựng thuốc.

+ Vận chuyển mẫu thuốc:

Tổng số 170 mẫu thuốc được lấy chuyển về labo thực hiện nuôi cấy nấm, 170 mẫu thuốc chuyển về Viện Dược liệu Quốc gia để định lượng aflatoxin

bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao. Các mẫu thuốc sau khi được lựa chọn, cho vào hộp xộp, đảm bảo kín, tránh ẩm ướt trong quá trình vận chuyển mẫu, kèm theo danh sách và mã túi đựng thuốc.

2.3.6. Nội dung nghiên cứu

2.3.6.1. Đánh giá điều kiện bảo quản thuốc cổ truyền trước can thiệp

Việc đánh giá các điều kiện bảo quản thuốc cổ truyền theo khảo sát toàn bộ 02 kho bảo quản thuốc cổ truyền của Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An trước khi triển khai can thiệp. Các tiêu chuẩn đánh giá theo Thông tư số 36/2018/TT-BYT ngày 22/11/2018 quy định về “Thực hành tốt bảo quản thuốc, nguyên liệu làm thuốc (GSP)”, Hà Nội [16].

- Đánh giá cơ sở vật chất và trang thiết bị bảo quản [16]

Các chỉ số theo dõi hoạt động điều kiện vi khí hậu bảo quản thuốc cổ truyền gồm: Kết cấu nhà kho bảo quản thuốc, trang thiết bị dụng cụ bảo quản thuốc, cụ thể:

- + Diện tích kho bảo quản.
- + Kết cấu kho (trần, tường, nền kho).
- + Hệ thống cửa kho.
- + Hệ thống thông gió.
- + Hệ thống chiếu sáng.
- + Hệ thống điều hòa nhiệt độ.
- + Máy hút ẩm.
- + Thiết bị theo dõi nhiệt độ, độ ẩm.
- + Giá kệ bảo quản thuốc.
- + Pallet kê hàng.
- + Trang thiết bị phòng chống côn trùng và động vật gây hại.

- Đánh giá thực hành bảo quản thuốc [16]

- + Việc thực hiện nguyên tắc GSP.

- + Tình trạng sắp xếp thuốc trong kho.
- + Khoảng cách thuốc với nền, tường và trần kho.
- + Việc phân khu thuốc nam và thuốc bắc.
- + Việc ghi chép sổ sách theo dõi nhiệt độ, độ ẩm.
- + Công tác vệ sinh kho bảo quản.
- + Công tác kiểm tra định kỳ chất lượng thuốc.

- *Đánh giá các yếu tố vi khí hậu kho bảo quản [16]*

Tại mỗi kho tiến hành đo: Nhiệt độ không khí ($^{\circ}\text{C}$), độ ẩm tương đối (%), tốc độ lưu thông không khí (m/s).

Các chỉ số được đo tại vị trí trung tâm kho, cách nền kho khoảng 1,5 m. Thời điểm đo: 08 giờ, 13 giờ, 16 giờ. Đo liên tục trong 03 ngày liên tiếp mỗi tháng. Giá trị trung bình được sử dụng để đánh giá điều kiện vi khí hậu của kho bảo quản.

- *Đánh giá tình trạng ô nhiễm nấm của thuốc cổ truyền sau can thiệp*

Lấy mẫu thuốc cổ truyền tại 02 kho bảo quản theo phương pháp đã mô tả ở mục tiêu 1. Các mẫu được xét nghiệm:

- + Tỷ lệ nhiễm nấm chung.
- + Thành phần loài nấm.
- + Tỷ lệ nhiễm *Aspergillus* spp.
- + Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác.

2.3.6.2. *Xây dựng và triển khai biện pháp can thiệp*

Căn cứ kết quả khảo sát thực trạng ban đầu, tiến hành xây dựng gói can thiệp nhằm cải thiện điều kiện vi khí hậu và chất lượng bảo quản thuốc cổ truyền tại 02 kho nghiên cứu.

- *Can thiệp về cơ sở vật chất*

- + Lắp đặt bổ sung máy hút ẩm công nghiệp.
- + Bổ sung hệ thống điều hòa nhiệt độ.

- + Bổ sung quạt thông gió.
- + Bổ sung nhiệt ẩm kế theo dõi tự động.
- + Sửa chữa các vị trí có nguy cơ thấm nước hoặc đọng ẩm.

- *Can thiệp về sắp xếp kho thuốc*

- + Sắp xếp lại toàn bộ vị trí bảo quản thuốc.
- + Thuốc được đặt trên pallet và giá kệ.
- + Bảo đảm khoảng cách tối thiểu: Cách nền ≥ 10 cm; Cách tường ≥ 20

cm; Cách trần ≥ 50 cm.

- + Phân khu riêng thuốc nam và thuốc bắc.
- + Phân khu riêng các vị thuốc có nguy cơ hút ẩm cao.

- *Can thiệp về quản lý bảo quản*

- + Xây dựng quy trình theo dõi nhiệt độ và độ ẩm kho.
- + Ghi chép nhật ký nhiệt độ, độ ẩm hằng ngày.
- + Kiểm tra định kỳ tình trạng thuốc bảo quản.
- + Thực hiện nguyên tắc nhập trước – xuất trước (FIFO).

- *Can thiệp về vệ sinh môi trường kho*

- + Tổng vệ sinh kho định kỳ.
- + Làm sạch giá kệ.
- + Kiểm soát côn trùng và động vật gây hại.
- + Loại bỏ các thuốc có dấu hiệu nấm mốc.

2.3.6.3. *Đánh giá kết quả sau can thiệp*

Sau 12 tháng triển khai can thiệp tiến hành đánh giá lại:

- + Trang thiết bị bảo quản.
- + Điều kiện thực hành bảo quản.
- + Nhiệt độ kho bảo quản.
- + Độ ẩm kho bảo quản.
- + Tốc độ lưu thông không khí.

Đồng thời lấy mẫu thuốc đông được tại 02 kho theo phương pháp tương tự trước can thiệp để xác định:

- + Tỷ lệ nhiễm nấm chung.
- + Tỷ lệ nhiễm *Aspergillus* spp.
- + Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác.

Kết quả trước và sau can thiệp nhằm đánh giá hiệu quả của các biện pháp cải thiện điều kiện vi khí hậu trong 2 kho bảo quản thuốc cổ truyền.

2.3.7. Các biến số trong nghiên cứu

Bảng 2.4. Các biến số sử dụng trong nghiên cứu

Tên biến số	Định nghĩa biến số	Phân loại	Phương pháp thu thập
Nhiễm nấm	Có/không phát hiện nấm trong mẫu thuốc cổ truyền	Nhị phân	Xét nghiệm nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud
Thành phần loài nấm phân lập được	Số loài nấm được phân lập từ mẫu thuốc đông được	Định danh	Xét nghiệm định loài nấm bằng hình thái
Vi khí hậu	Là các điều kiện nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ gió trong một phạm vi hẹp như 1 nhà kho, 1 phân xưởng sản xuất.	Định lượng	Đo các thông số nhiệt độ, độ ẩm tương đối, tốc độ gió
Độ ẩm tương đối trung bình ở kho chứa thuốc	Là trung bình cộng của độ ẩm tương đối đo được ở 5 vị trí kho thuốc: 4 góc kho, trung tâm kho (%)	Biến định	Đo nhiệt độ bằng ẩm kế ở 5 vị trí kho thuốc
Nhiệt độ trung bình trong kho thuốc	Là trung bình cộng của nhiệt độ đo trong kho thuốc ở 5 vị trí: 4 góc kho, chính giữa kho (t°)	Liên tục	Đo nhiệt độ bằng nhiệt kế 5 vị trí kho thuốc
Tốc độ gió trung bình	Là vận tốc trung bình lưu thông không khí trong nhà kho đo ở 5 vị trí (m/s) 4 góc kho, chính giữa kho	Liên tục	Đo tốc độ lưu thông không khí bằng phong tốc kế

2.3.8. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.3.8.1. Kỹ thuật lựa chọn mẫu thuốc cổ truyền

Như mục tiêu 1

2.3.8.2. Kỹ thuật chẩn đoán nhiễm nấm bằng hình thái

Kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud như mục tiêu 1.

2.3.9. Các chỉ số nghiên cứu

- Tỷ lệ nhiễm nấm trước và sau can thiệp

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ nhiễm nấm chung} \\ \text{của 170 mẫu thuốc trước} \\ \text{và sau can thiệp (\%)} \end{array} = \frac{\text{Số mẫu thuốc cổ truyền (+) với nấm}}{170 \text{ mẫu thuốc trước, sau can thiệp}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ nhiễm nấm của} \\ \text{các mẫu thuốc bắc} \\ \text{hoặc thuốc nam trước} \\ \text{và sau can thiệp (\%)} \end{array} = \frac{\text{Số mẫu thuốc bắc hoặc thuốc} \\ \text{nam xét nghiệm (+) với nấm}}{\text{Tổng số mẫu thuốc bắc hoặc} \\ \text{thuốc nam trước và sau can thiệp}} \times 100$$

$$\begin{array}{l} \text{Tỷ lệ nhiễm nấm} \\ \text{Aspergillus spp của} \\ \text{các mẫu thuốc bắc} \\ \text{hoặc thuốc nam trước} \\ \text{và sau can thiệp (\%)} \end{array} = \frac{\text{Số mẫu thuốc bắc hoặc thuốc nam xét} \\ \text{nghiệm (+) với nấm Aspergillus spp}}{\text{Tổng số mẫu thuốc bắc hoặc thuốc} \\ \text{nam trước và sau can thiệp}} \times 100$$

- Hiệu quả can thiệp làm giảm tỷ lệ nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền

$$\text{CSHQ (\%)} = \frac{p_1 - p_2}{p_1} \times 100$$

Trong đó:

p_1 là tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền trước can thiệp;

p_2 là tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền sau can thiệp;

HQCT: Hiệu quả can thiệp

- Tiêu chuẩn môi trường không khí kho đạt tiêu chuẩn bảo quản thuốc

Một kho thuốc đạt tiêu chuẩn bảo quản thuốc phải đáp ứng các tiêu chí về vi khí hậu như sau: Nhiệt độ trung bình ở 4 góc kho và giữa trung tâm kho < 25°C; Độ ẩm tương đối (%) < 70%; Tốc độ gió 0,5 - 1 m/giây [16].

- Các điều kiện khác

Có hộp đựng riêng cho từng vị thuốc, mỗi hộp có dán nhãn riêng, có điều hòa nhiệt độ, có máy hút ẩm, có máy đo nhiệt độ và độ ẩm, có quạt thông gió, có túi hóa chất hút ẩm [16].

2.4. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Số liệu định lượng thu thập được qua xét nghiệm sẽ được nhập và phân tích bằng phần mềm Epi - Info 6.04, SPSS và Stata 16.0 [116].

2.5. Sai số và hạn chế sai số

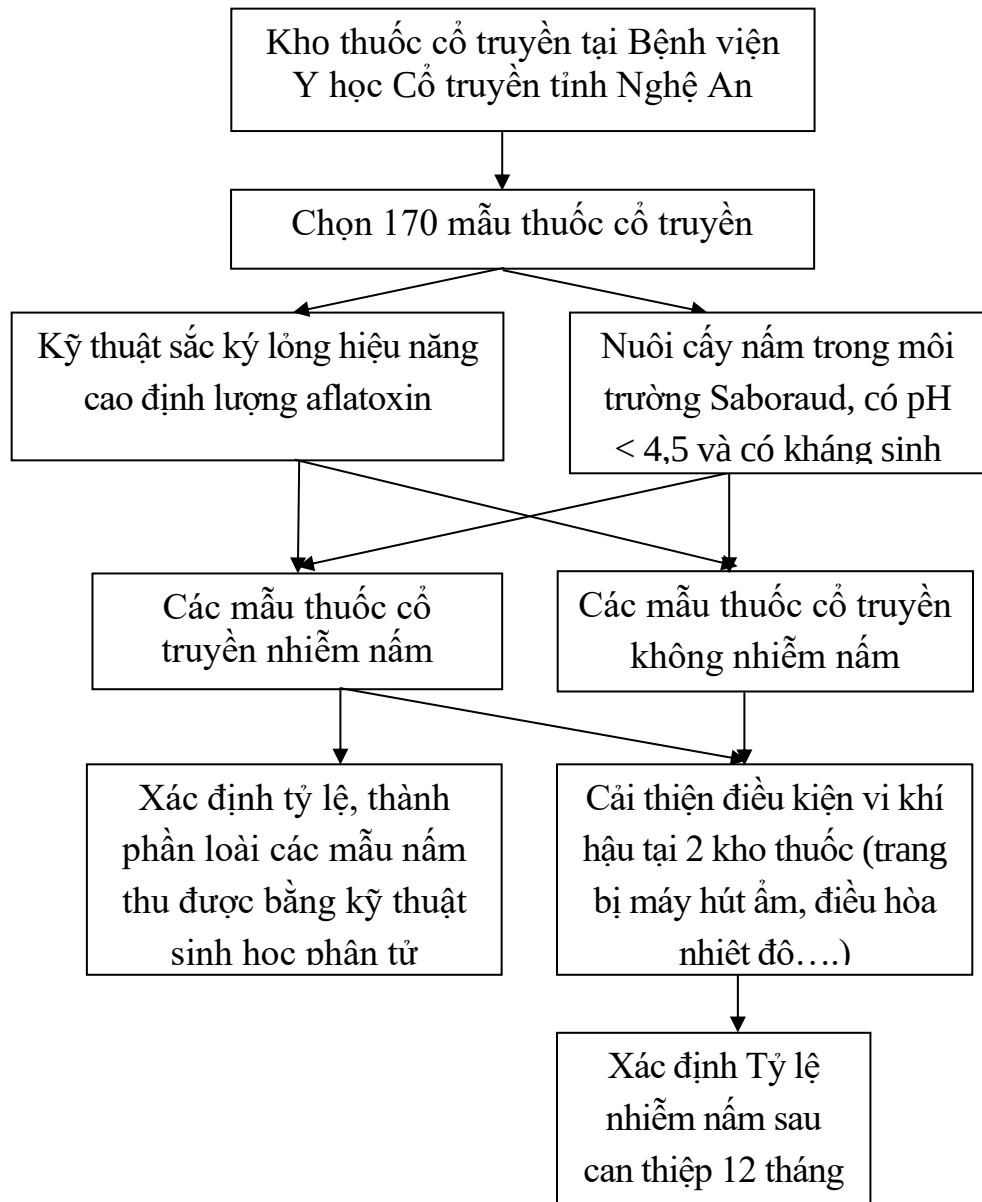
Sai số gồm sai số hệ thống và sai số ngẫu nhiên. Để hạn chế sai số cần: Đảm bảo cỡ mẫu đủ lớn theo tính toán; Tuân thủ các nguyên tắc lựa chọn, sàng tuyển vào mẫu nghiên cứu; Nghiên cứu thử trước khi nghiên cứu chính thức.

2.6. Đạo đức nghiên cứu

Đảm bảo tuân thủ các quy trình nghiên cứu. Giữ bí mật về các vấn đề của Bệnh viện liên quan đến tình trạng nhiễm nấm và aflatoxin. Đề tài được thông qua Hội đồng Y đức của Viện Sốt rét – KST – CTTU, Hội đồng Y đức của Sở Y tế tỉnh Nghệ An [116].

2.7. Mô hình thiết kế nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu được mô hình hóa như sau:



Hình 2.3. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

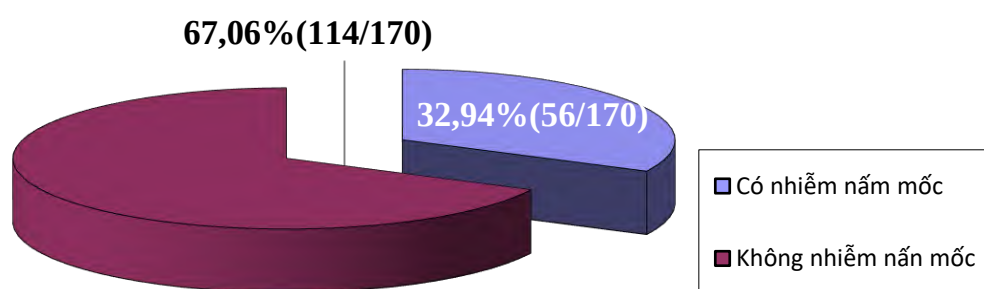
3.1. Tỷ lệ nhiễm và thành phần loài nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023.

3.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền

Bảng 3.1. Đặc điểm các mẫu thuốc trong nghiên cứu (n =170)

Đặc điểm	Thuốc nam	Thuốc bắc	Tổng	Tỷ lệ (%)
Rễ	42	25	67	39,41
Con	1	2	3	1,76
Thân	11	27	38	22,35
Cành	0	4	4	2,35
Lá, hoa, quả, hạt	29	20	49	28,82
Khác	6	3	9	5,29
Tổng	89	81	170	100

Các mẫu thuốc trong nghiên cứu này chủ yếu là rễ, thân, lá, hoa, quả, hạt; vị thuốc nam và thuốc bắc tương đương nhau.



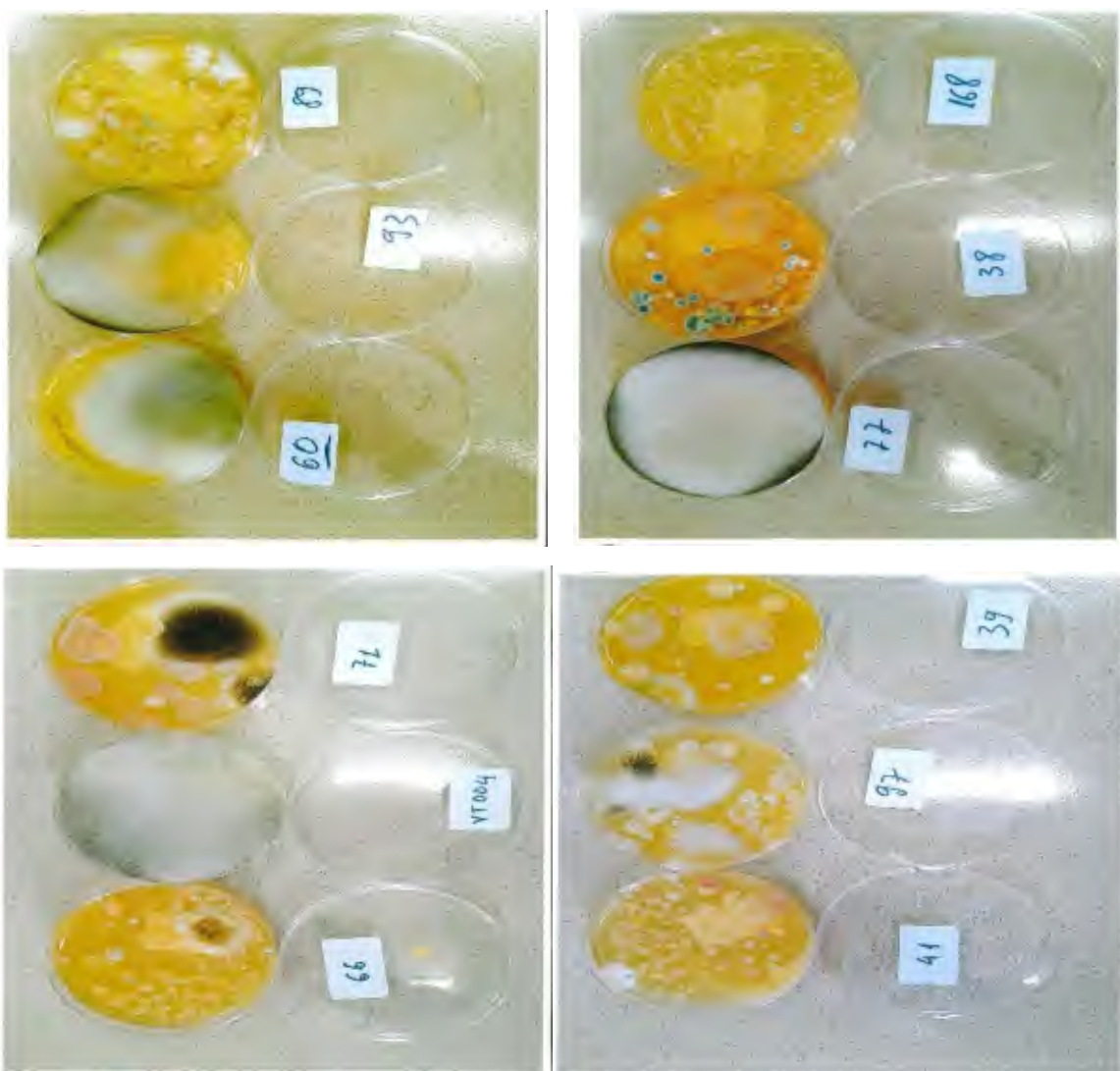
Hình 3.1. Tỷ lệ nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền (n = 170)

Tỷ lệ nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền tại bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An là 32,94%.

Bảng 3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc bắc và thuốc nam (n =170)

Nhóm vị thuốc	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Giá trị p
Các vị thuốc bắc (1)	89	33	37,10	$p_{(1;2)} > 0,05$
Các vị thuốc nam (2)	81	23	28,40	
Tổng	170	56	32,94	

Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc nam và các vị thuốc bắc khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

**Hình 3.2. Khuẩn lạc nấm nuôi cấy trong môi trường Saboraud**

Các khuẩn lạc nấm dạng sợi, màu sắc khác nhau trắng, trắng xám.

**Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền
có nguồn gốc là thân, rễ, lá, củ, quả, con (n=170)**

Vị thuốc	Số xét nghiệm	Số nhiễm nấm	Tỷ lệ (%)	Giá trị p
Rễ (1)	67	27	40,30	$p_{(1;2,3,4)} > 0,05$
Thân (2)	38	9	23,68	
Cành, lá, hoa, quả, hạt (3)	53	17	32,07	
Khác (4)	12	3	25,00	
Tổng	170	56	32,94	

Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc có nguồn gốc từ rễ cao nhất (40,30%), tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc lấy từ thân thấp nhất (23,68%).

Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc làm từ rễ, thân, cành – lá- hoa – quả khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê, với $p > 0,05$.

3.1.2. Kết quả xác định thành phần loài nấm

3.1.2.1. Kết quả định danh bằng hình thái học

**Bảng 3.4. Kết quả xác định số lượng mẫu nấm
khác nhau về đặc điểm hình thái học (n = 56)**

Số loại nấm nhiễm	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)
Nhiễm 1 loại	50	89,29
Nhiễm 2 loại	5	8,93
Nhiễm 3 loại	1	1,79
Tổng số	56	100,0

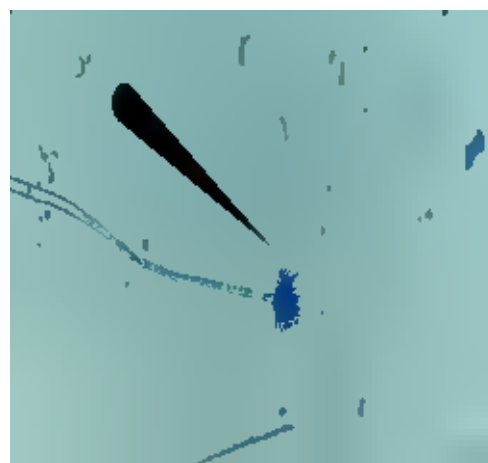
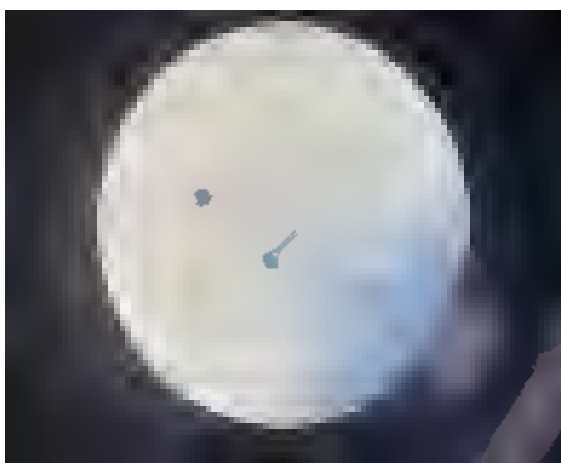
Có 56 mẫu nhiễm nấm, trong đó 50 mẫu (89,29%) nhiễm 01 loại nấm, 5/56(8,93%) nhiễm 2 loại nấm, 1/56(1,79%) nhiễm 3 loại nấm.

Bảng 3.5. Kết quả xác định giống nấm phân lập nấm từ các vị thuốc cổ truyền dựa vào đặc điểm hình thái

Giống nấm	Nhiễm 1 loài	Nhiễm 2 loài	Nhiễm 3 loài	Tổng
<i>Aspergillus</i>	18	2	1	25
<i>Rhizopus</i>	16	0	0	16
<i>Penicillium</i>	10	0	0	10
<i>Fusarium</i>	4	0	0	4
<i>Cladosporium</i>	1	0	0	1
<i>Phoma spp</i>	1	0	0	1
<i>Aspergillus + Penicillium</i>	0	3	0	3
Tổng số mẫu nhiễm	50	5	1	63

Trong 56 mẫu nhiễm nấm có: 50 mẫu nhiễm một loài nấm, 05 mẫu nhiễm 2 loài, 01 mẫu nhiễm 03 loài.

Tổng số 63 mẫu (chủng), trong đó: *Aspergillus* là 28(44,44%), *Rhizopus* 16(25,40%), *Penicillium* là 13(20,63%), *Fusarium* là 4(6,35%), *Phoma spp* là 1 (1,59%) và *Cladosporidium* là 1 (1,59%).



Hình 3.3. Hình ảnh sợi nấm, bào tử *Aspergillus* trong tiêu bản nhuộm Methylene blue trong nghiên cứu này

Các sợi nấm *Aspergillus* spp điển hình khi nhuộm Methylene blue, gồm sợi nấm, bào tử, đỉnh bào tử hình hoa cúc.

3.1.2.2. Kết quả định danh loài bằng kỹ thuật sinh học phân tử

- **Tách chiết DNA:**

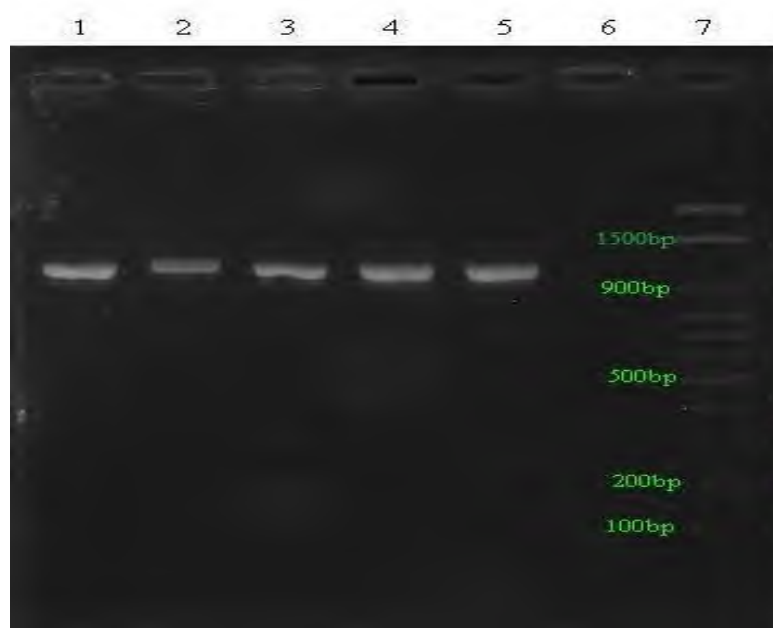
Các mẫu nấm được tách chiết DNA bằng bộ kit Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. # 27300, Norgen Biotek Corp, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- **Khuyếch đại đoạn gen:**

DNA của nấm sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn (template) cho phản ứng PCR. Cặp mồi ITS5 và NL4 khuếch đại đoạn gen chứa 1 phần gen 18S rDNA; Toàn bộ đoạn gen 5.8S rDNA; Toàn bộ các đoạn giao gen ITS1, ITS2 và một phần gen 28S rDNA của vi nấm, kích thước khoảng 1000-1200bp, tùy từng loài nấm.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di.

Kết quả tách chiết PCR và chạy điện di như sau:

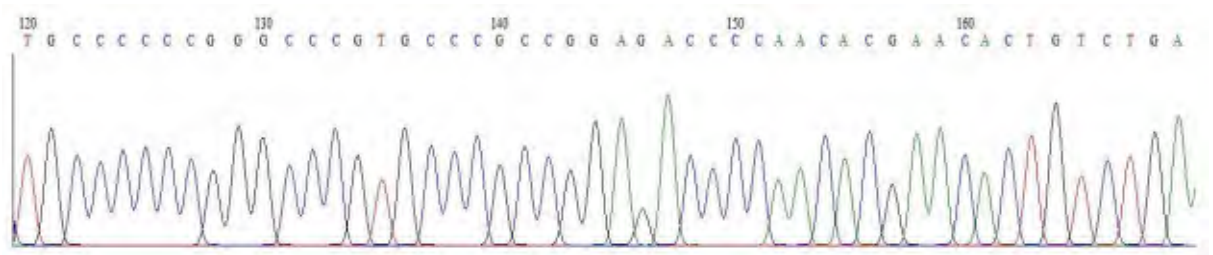


Hình 3.4. Sản phẩm điện di một số mẫu nấm phân lập từ các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền Nghệ An

Hình ảnh chạy điện di trên gel thạch agarose là các băng sáng rõ nét, kích thước xấp xỉ 900 bp, đúng với giá trị kích thước mong muốn và phù hợp với kích thước của các mẫu nấm chuẩn trong ngân hàng Gen bank. Sản phẩm PCR tinh sạch, gửi đi giải trình tự và được so sánh với các trình tự sẵn có trên ngân hàng Gen bank để xác định loài nấm.

Kết quả kiểm định như hình 3.5, hình 3.6, hình 3.7 sau:

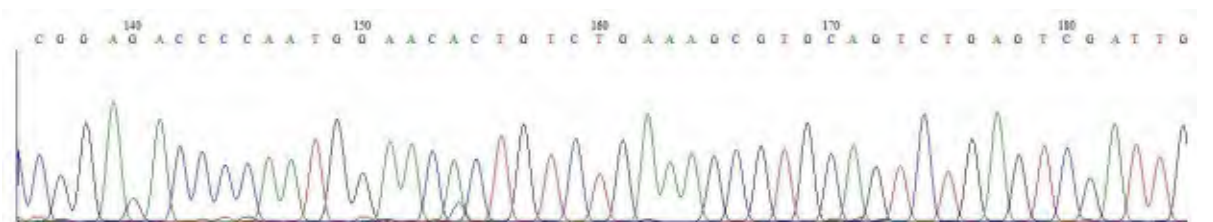
Aspergillus niger



Aspergillus flavus



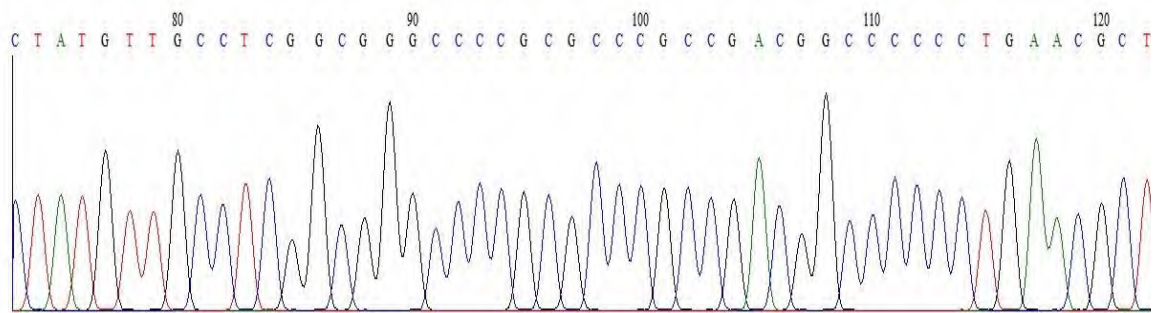
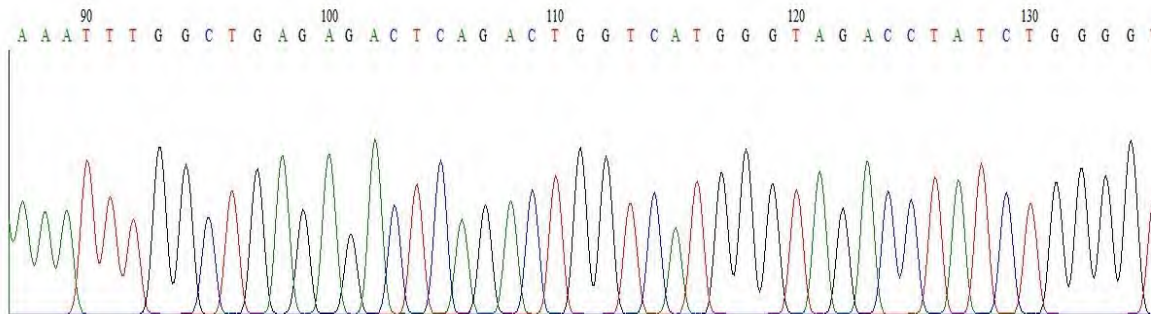
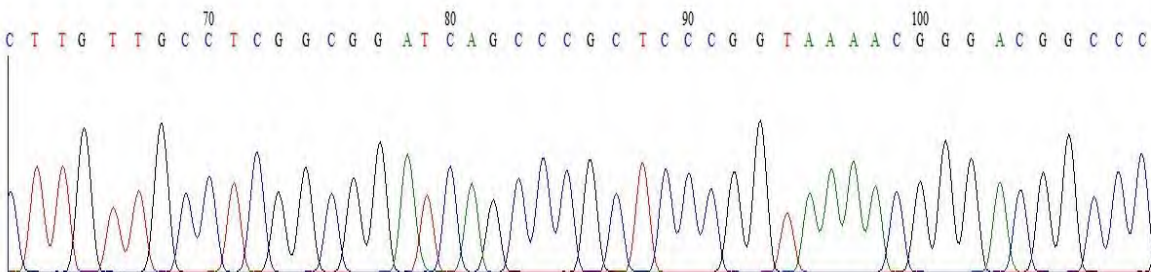
Aspergillus fijiensis



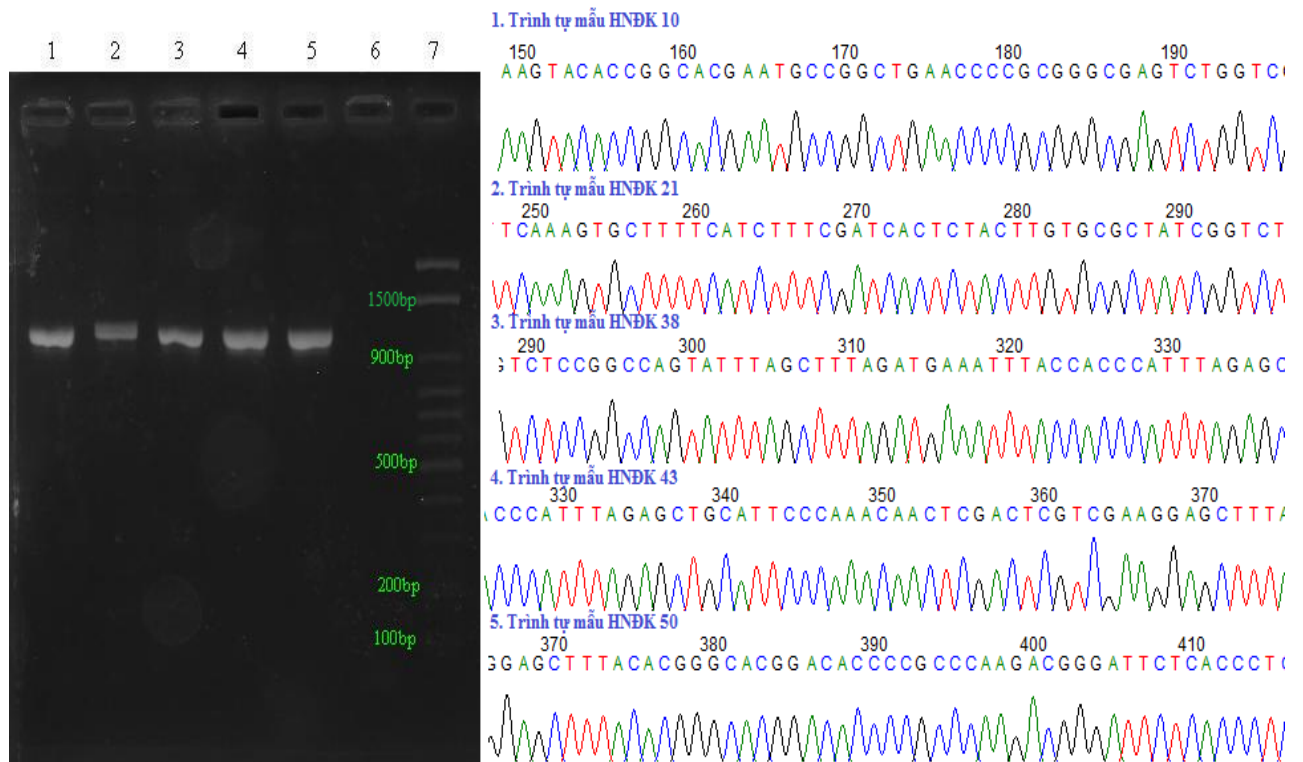
Aspergillus terreus



Hình 3.5. Kết quả giải trình tự gen các mẫu *Aspergillus* spp

Penicillium oxalicum*Rhizopus arrhizus**Fusarium oxysporum**Penicillium implicatum*

Hình 3.6. Kết quả giải trình tự gen các mẫu nấm khác



Hình 3.7. Kết quả điện di trên thạch và giải trình tự gen

Các trình tự thu được sau đó được đăng ký trên ngân hàng gen và được cấp mã số bản quyền.

Bảng 3.6. Tổng hợp các trình tự thu được trong nghiên cứu này và đăng ký trên ngân hàng gen (n = 63)

TT	Ký hiệu chủng	Tên loài	Mã số trên genbank
1	VT02	<i>Aspergillus flavus</i>	OR473256
2	VT16	<i>Aspergillus chevalieri</i>	OR501567
3	VT20.1	<i>Aspergillus fijiensis</i>	OR501568
4	VT20.2	<i>Aspergillus sydowii</i>	OR501569
5	VT25	<i>Aspergillus flavus</i>	OR528042
6	VT29	<i>Aspergillus chevalieri</i>	OR528596
7	VT31.2	<i>Aspergillus terreus</i>	OR528598
8	VT34	<i>Aspergillus niger</i>	OR528599

9	VT35.1	<i>Aspergillus niger</i>	OR528600
10	VT35.2	<i>Aspergillus terreus</i>	OR528601
11	VT39	<i>Aspergillus flavus</i>	OR625087
12	VT61	<i>Aspergillus niger</i>	OR625088
13	VT64	<i>Aspergillus flavus</i>	OR625089
14	VT66	<i>Aspergillus niger</i>	OR625091
15	VT69	<i>Aspergillus sydowii</i>	OR625092
16	VT71	<i>Aspergillus niger</i>	OR625093
17	VT78	<i>Aspergillus niger</i>	OR625095
18	VT80	<i>Aspergillus niger</i>	OR625096
19	VT82.2	<i>Aspergillus terreus</i>	OR625100
20	VT89	<i>Aspergillus</i> spp	OR625101
21	VT93	<i>Aspergillus flavus</i>	OR625103
22	VT97	<i>Aspergillus niger</i>	OR625105
23	VT103	<i>Aspergillus chevalieri</i>	OR625106
24	VT105.2	<i>Aspergillus niger</i>	OR625108
25	VT107.1	<i>Aspergillus restrictus</i>	OR625110
26	VT107.2	<i>Aspergillus neotritici</i>	OR625111
27	VT107.3	<i>Aspergillus chevalieri</i>	OR625112
28	VT159	<i>Aspergillus niger</i>	OR625117
29	VT10	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR501566
30	VT22	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR501570
31	VT26	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR528043
32	VT27	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR528044
33	VT28	<i>Rhizopus microsporus</i>	OR528045
34	VT48	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR536567
35	VT60	<i>Rhizopus microsporus</i>	OR536570
36	VT72	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR536571

37	VT04	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625084
38	VT11	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625085
39	VT14	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625086
40	VT77	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625094
41	VT83	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625098
42	VT96	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625104
43	VT113	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625114
44	VT161	<i>Rhizopus arrhizus</i>	OR625118
45	VT31.1	<i>Penicillium implicatum</i>	OR528597
46	VT38	<i>Penicillium implicatum</i>	OR536565
47	VT41	<i>Penicillium oxalicum</i>	OR536566
48	VT54	<i>Penicillium citrinum</i>	OR536568
49	VT57	<i>Penicillium oxalicum</i>	OR536569
50	VT76	<i>Penicillium citrinum</i>	OR536573
51	VT65	<i>Penicillium citrinum</i>	OR625090
52	VT88.1	<i>Penicillium implicatum</i>	OR625099
53	VT105.1	<i>Penicillium citrinum</i>	OR625107
54	VT106	<i>Penicillium citrinum</i>	OR625109
55	VT114	<i>Penicillium oxalicum</i>	OR625115
56	VT119	<i>Penicillium citrinum</i>	OR625116
57	VT168	<i>Penicillium citrinum</i>	OR625120
58	VT74	<i>Fusarium oxysporum</i>	OR536572
59	VT82	<i>Fusarium oxysporum</i>	OR625097
60	VT90	<i>Fusarium oxysporum</i>	OR625102
61	VT110	<i>Fusarium oxysporum</i>	OR625113
62	VT05	<i>Cladosporium halotolerans</i>	OR473257
63	VT162	<i>Phoma</i> spp.	OR625119

Trong 63 mẫu nấm, có 61 mẫu đã xác định rõ tên loài, có 02 mẫu chưa xác định được tên loài, mới xác định được giống (chi) là mẫu VT89 là giống *Aspergillus* spp và VT163 là giống *Phoma* spp.

Giống *Aspergillus* có số lượng cao nhất 28 mẫu chiếm 44,44%. Thành phần loài của giống *Aspergillus* như bảng 3.7 sau:

Bảng 3.7. Tỷ lệ các loài nấm trong giống *Aspergillus* (n =28)

Loài nấm	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
		Trong số <i>Aspergillus</i> (n=28)	Trong tổng số mẫu (n=63)
<i>Aspergillus niger</i>	10	35,72	15,87
<i>Aspergillus flavus</i>	05	17,86	7,94
<i>Aspergillus chevalieri</i>	05	17,86	7,94
<i>Aspergillus terreus</i>	02	7,14	3,17
<i>Aspergillus sydowii</i>	02	7,14	3,17
<i>Aspergillus fijiensis</i>	01	3,57	1,59
<i>Aspergillus restrictus</i>	01	3,57	1,59
<i>Aspergillus neotritici</i>	01	3,57	1,59
<i>Aspergillus</i> spp.	01	3,57	1,59
Tổng	28	100	44,44

Aspergillus chiếm 44,44% số chủng nấm mốc phân lập được. Đã phát hiện 8 loài nấm, trong đó *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 35,72%(10/28).

Loài *As. flavus* và *As. chevalieri* chiếm 15,87% (05/28).

Các loài *As. fijiensis*, *As. restrictus*, *As. neotritici*, *Aspergillus* spp mỗi loài chiếm 1,59%(1/28)

Bảng 3.8. Phân bố các loài nấm trong giống *Aspergillus*

Nhiễm đơn, nhiễm phối hợp	Loài nấm <i>Aspergillus</i> spp	Số lượng
Nhiễm đơn	<i>Aspergillus chevalieri</i>	4
	<i>Aspergillus fijiensis</i>	1
	<i>Aspergillus flavus</i>	5
	<i>Aspergillus niger</i>	10
	<i>Aspergillus restrict</i>	1
	<i>Aspergillus</i> spp.	1
	<i>Aspergillus sydowii</i>	1
	<i>Aspergillus terreus</i>	1
	<i>Aspergillus</i> spp.	1
Nhiễm phối hợp	<i>Aspergillus fijiensi</i> + <i>Aspergillus sydowii</i>	1
	<i>Aspergillus niger</i> + <i>Aspergillus terreus</i>	1
	<i>Aspergillus restrict</i> + <i>Aspergillus neotritici</i> + <i>Aspergillus chevalieri</i>	1
Tổng	10 loài	28 mẫu

Đã phát hiện 28 mẫu *Aspergillus*, thuộc 8 loài, trong đó có 02 mẫu đồng nhiễm 2 loài, 01 mẫu đồng nhiễm 3 loài *Aspergillus*.

Bảng 3.9. Tỷ lệ các loài nấm khác

Giống	Loài	Số lượng	Tỷ lệ (%)	
			Trong cùng giống	Trong tổng số mẫu (n=63)
<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	14	87,50	22,22
	<i>Rhizopus microsporus</i>	02	12,50	3,17
	Tổng	16	100,0	25,39
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	07	53,85	11,11
	<i>Penicillium implicatum</i>	03	23,08	4,76
	<i>Penicillium oxalicum</i>	03	23,08	4,76
	Tổng	13	100,0	20,63
<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	04	100,0	6,35
<i>Phoma</i>	<i>Phoma</i> spp.	01	100,0	1,59
<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium halotolerans</i>	01	100,0	1,59
Tổng	16 loài	35	100,00	55,56

Đã xác định được 5 giống nấm khác gồm *Rhizopus* spp; *Penicillium* spp; *Fusarium* spp; *Phoma* sp, *Cladosporidium*. Năm giống nấm này chiếm 55,56%(35/63) tổng số mẫu phân lập được.

Rhizopus spp chiếm tỷ lệ cao nhất 25,39%(16/35), có 2 loài, trong đó *R. arrhizus* chiếm tỷ lệ chủ yếu 87,50%(14/16);

Penicillium spp có 3 loài ; *Fusarium* spp có 1 loài, *Cladosporium* có 1 loài; *Phoma* spp chưa xác định được loài.

Bảng 3.10. Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* ở thuốc bắc, thuốc nam

Nguồn gốc mẫu thuốc	Số xét nghiệm	Số nhiễm nấm	Tỷ lệ (%)	p
Thuốc bắc (1)	89	16	17,98	$p_{(1;2)} > 0,05$ (0,185)
Thuốc nam (2)	81	8	9,88	
Tổng	170	24	14,12	

Tỷ lệ nhiễm *Aspergillus* chung ở các mẫu thuốc cổ truyền là 14,12% (24/170). Tỷ lệ nhiễm *Aspergillus* ở thuốc bắc và thuốc nam khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với các giá trị 17,98% so với 9,88%, $p > 0,05$

Bảng 3.11. Tỷ lệ nhiễm nấm khác ở thuốc bắc và thuốc nam (n =170)

Nguồn gốc mẫu thuốc	Số xét nghiệm	Số nhiễm nấm	Tỷ lệ (%)	p
Thuốc bắc (1)	89	17	21,3	$p_{(1;2)} > 0,05$ (0,185)
Thuốc nam (2)	81	15	19,8	
Tổng	170	32	22,94	

Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác ở các mẫu thuốc cổ truyền là 22,94%(32/170), trong đó tỷ lệ nhiễm ở thuốc bắc là 21,3%, thuốc nam 19,8%, tuy nhiên sự khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Bảng 3.12. Tỷ lệ nhiễm nấm theo nguồn gốc (n = 170)

Nguồn gốc mẫu thuốc	Số lượng	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
Nguồn gốc thực vật (1)	158	53	33,54	$p_{(1;2)} > 0,05$
Nguồn gốc khác (động vật, chất khoáng...) (2)	12	3	25,0	
Tổng	170	56	32,94	

Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc có nguồn gốc thực vật là 33,54%, động vật và chất khoáng 25,0%. Không có sự khác biệt về tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc có nguồn gốc thực vật và động vật 33,54% so với 25,00% với $p > 0,05$

Bảng 3.13. Tỷ lệ nhiễm *Aspergillus* theo các bộ phận của thuốc (n =170)

Nguồn gốc mẫu thuốc	Số lượng	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
Rễ (1)	67	10	14,93	$p_{(1;2,3,4)} > 0,05$ (0,932)
Thân (2)	38	5	13,16	
Cành, lá, hoa, quả, hạt (3)	53	8	15,09	
Khác (4)	12	1	8,33	
Tổng	170	24	14,12	

Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* chung ở các bộ phận khác nhau của thuốc cổ truyền là 14,12%.

Khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* ở các bộ phận của thuốc là rễ, thân và cành lá hoa quả với các tỷ lệ 14,93% so với 13,16%, 15,09% và 8,33% với $p > 0,05$).

Bảng 3.14. Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác thuốc theo bộ phận thuốc (n =170)

Nguồn gốc mẫu thuốc	Số lượng	Số nhiễm	Tỷ lệ (%)	p
Rễ (1)	67	17	25,37	$p_{(1;2,3,4)} > 0,05$ (0,232)
Thân (2)	38	5	13,16	
Cành, lá, hoa, quả, hạt (3)	53	8	15,01	
Khác (4)	12	2	16,67	
Tổng	170	32	20,59	

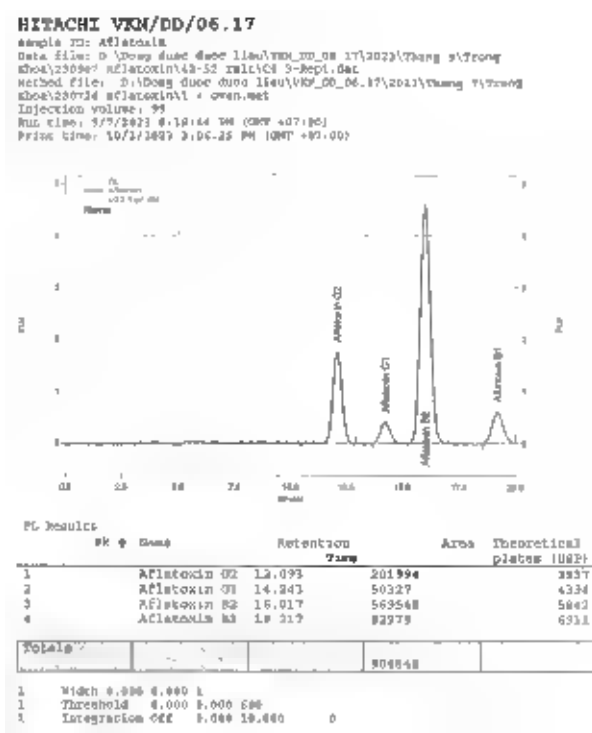
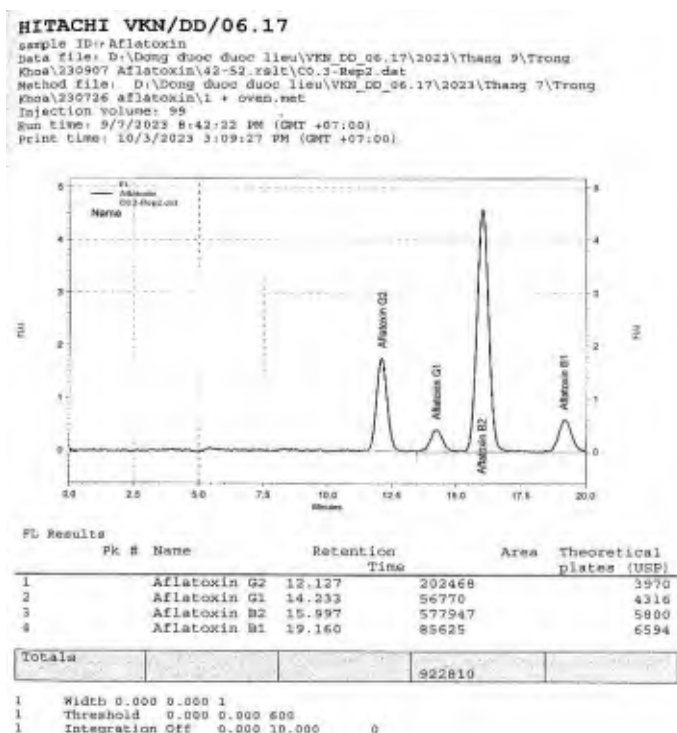
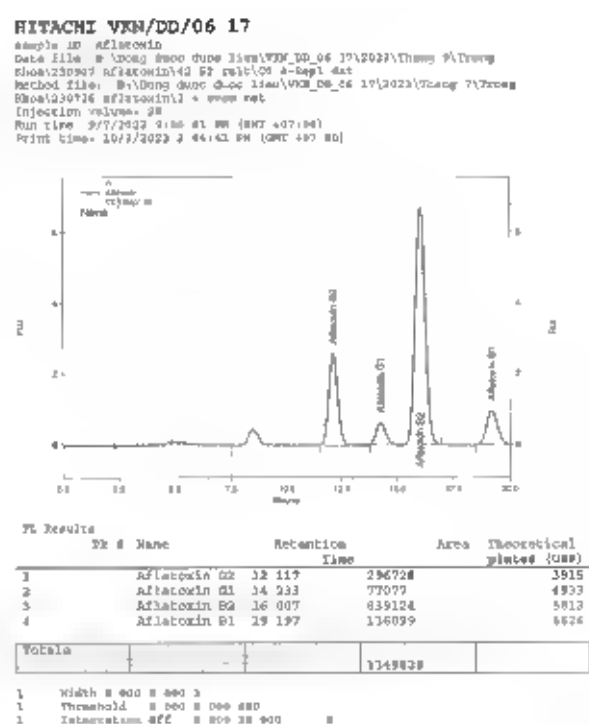
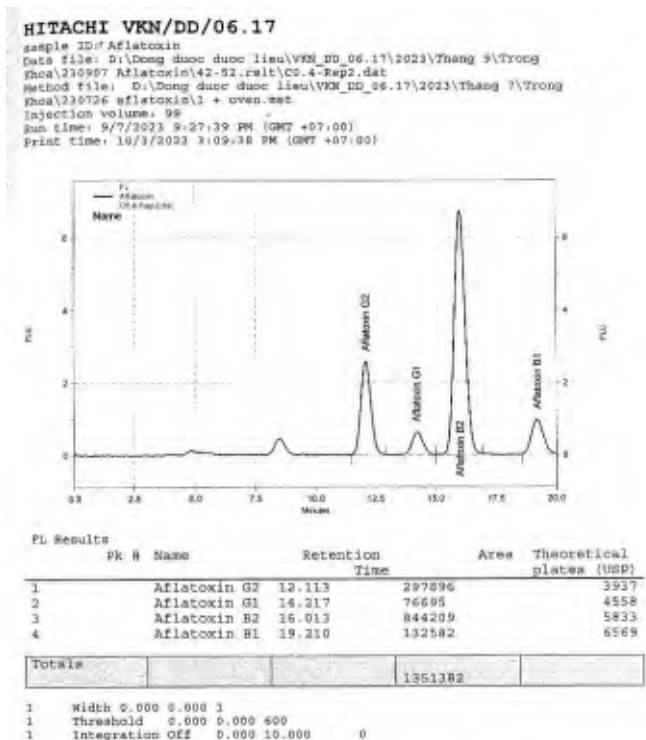
Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác ở các bộ phận của thuốc cổ truyền khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

3.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An

3.2.1. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin

Với 170 mẫu thuốc cổ truyền được xét nghiệm định lượng aflatoxin tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Quốc gia bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao chạy trên máy HPLC.

Mỗi mẫu chạy sắc ký theo thời gian thực, chạy 4 lần, mỗi lần cách nhau 3 giờ, kết quả được ghi lại theo thời gian thực như hình 3.8, hình 3.9 sau:

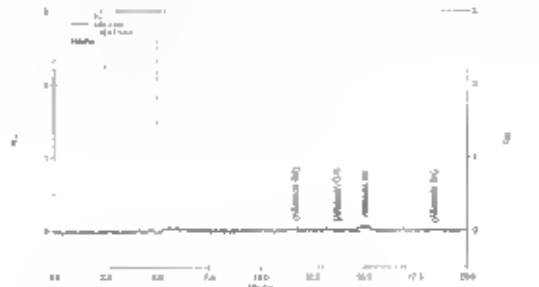


Hình 3.8. Sắc ký đồ mẫu (+) aflatoxin B1, B2, G1, G2
 theo thời gian lưu mẫu

Sắc ký đồ là một đường liên tục dao động có các giá trị đỉnh tương ứng với nồng độ đỉnh của từng loại aflatoxin B1, B2, G1, G2 trong mẫu

HITACHI VKN/DD/06.17

sample ID: Aflatoxin
Data file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 Aflatoxin\45.45-53-55-56\1\Thu 54.1.dat
Method file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 aflatoxin\1 + cron.net
Injection volume: 99
Run time: 9/13/2023 9:02:07 PM (GMT +07:00)
Print time: 10/3/2023 9:40:12 PM (GMT +07:00)

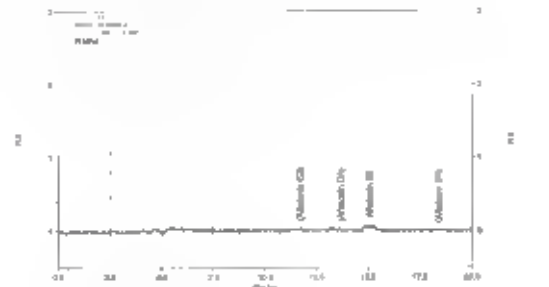


PK #	Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)
1	Aflatoxin G2 Aflatoxin G1 Aflatoxin B2 Aflatoxin B1	15.070	7595	0
Totals			7595	

1 Width: 0.000 0.000 1
1 Threshold: 0.000 0.000 400
1 Integration Off: 0.000 10.000 0

HITACHI VKN/DD/06.17

sample ID: Aflatoxin
Data file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 Aflatoxin\45.45-53-55-56\1\Thu 54.1.dat
Method file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 aflatoxin\1 + cron.net
Injection volume: 99
Run time: 9/13/2023 9:02:07 PM (GMT +07:00)
Print time: 10/3/2023 9:40:12 PM (GMT +07:00)

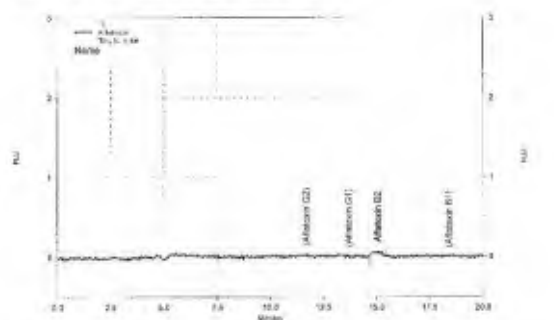


PK #	Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)
1	Aflatoxin G2 Aflatoxin G1 Aflatoxin B2 Aflatoxin B1	15.070	7595	0
Totals			7595	

1 Width: 0.000 0.000 1
1 Threshold: 0.000 0.000 400
1 Integration Off: 0.000 10.000 0

HITACHI VKN/DD/06.17

sample ID: Aflatoxin
Data file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 Aflatoxin\45.45-53-55-56\1\Thu 54.1.dat
Method file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 aflatoxin\1 + cron.net
Injection volume: 99
Run time: 9/13/2023 9:02:07 PM (GMT +07:00)
Print time: 10/3/2023 9:45:12 PM (GMT +07:00)

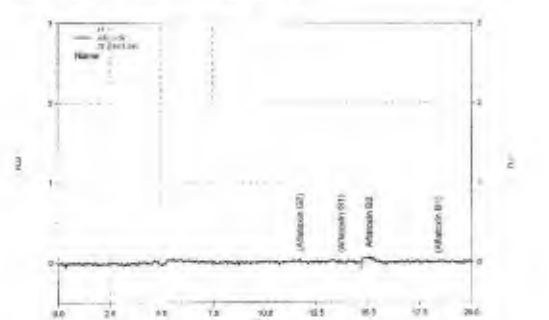


PK #	Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)
1	Aflatoxin G2 Aflatoxin G1 Aflatoxin B2 Aflatoxin B1	15.070	7595	0
Totals			7595	

1 Width: 0.000 0.000 1
1 Threshold: 0.000 0.000 400
1 Integration Off: 0.000 10.000 0

HITACHI VKN/DD/06.17

sample ID: Aflatoxin
Data file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 Aflatoxin\45.45-53-55-56\1\Thu 54.1.dat
Method file: D:\Dong duoc duoc lieu\VKN_DD_06.17\2023\Thang 9\Trong
Thoi\230913 aflatoxin\1 + cron.net
Injection volume: 99
Run time: 9/13/2023 9:02:07 PM (GMT +07:00)
Print time: 10/3/2023 9:45:12 PM (GMT +07:00)



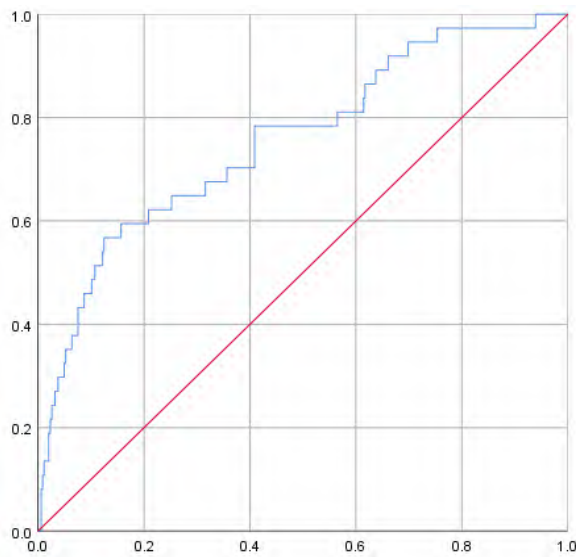
PK #	Name	Retention Time	Area	Theoretical plates (USP)
1	Aflatoxin G2 Aflatoxin G1 Aflatoxin B2 Aflatoxin B1	15.070	7595	0
Totals			7595	

1 Width: 0.000 0.000 1
1 Threshold: 0.000 0.000 400
1 Integration Off: 0.000 10.000 0

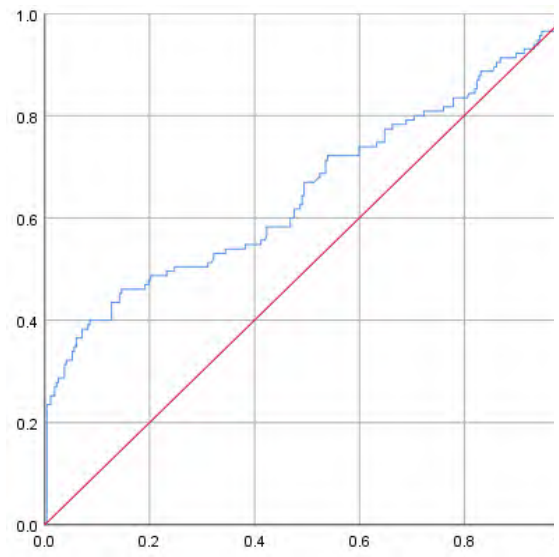
Hình 3.9. Sắc ký đồ mẫu(-) với

aflatoxin B1, B2, G1, G2 theo thời gian lưu mẫu

Sắc ký đồ là một đường liên tục dao động quanh giá trị 0, không có các giá trị đỉnh tương ứng với nồng độ đỉnh của aflatoxin trong mẫu

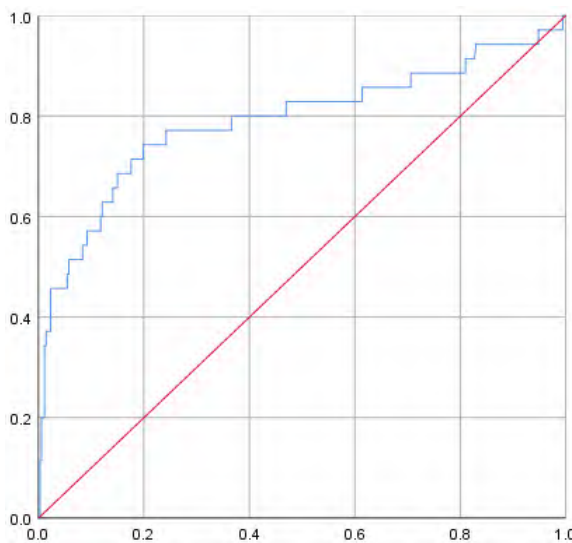


(a) Mẫu (+) B1: Cut off: 50%; Độ nhạy 81,16%; Độ đặc hiệu 87,50%; AUC 0,76

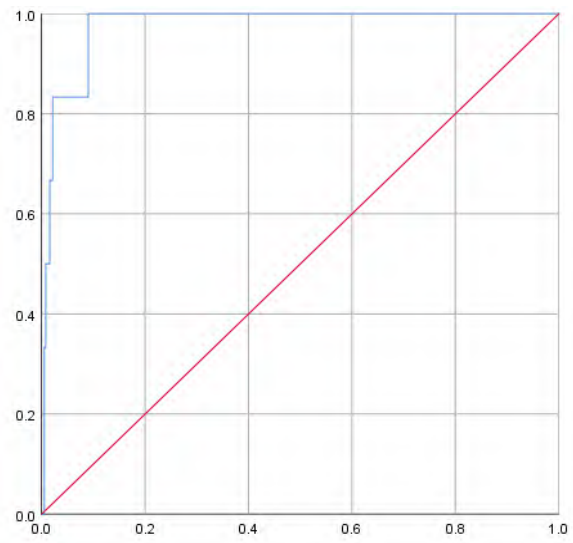


(b) Mẫu B2: Cut off: 50%; Độ nhạy 76,1%; Độ đặc hiệu 90,6%; AUC 0,68

Hình 3.10: Đường cong ROC của nồng độ aflatoxin B1, B2



(a) Mẫu (+) G1: Cut off: 50%; Độ nhạy 77,1%; Độ đặc hiệu 88,50%; AUC 0,79



(b) Mẫu G2: Cut off: 50%; Độ nhạy 100%; Độ đặc hiệu 91,0%; AUC 0,97

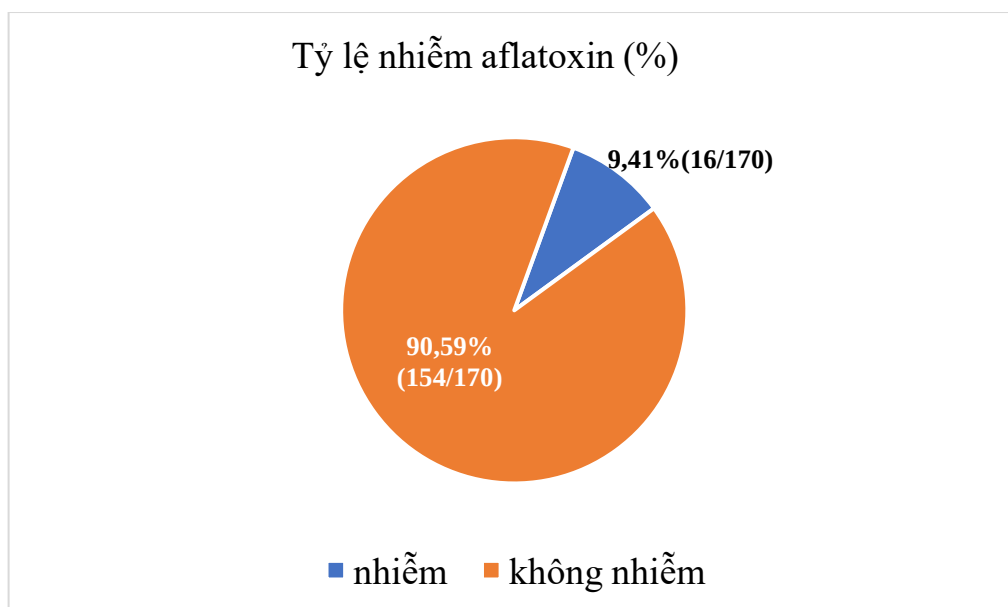
Hình 3.11: Đường cong ROC của nồng độ aflatoxin G1, G2

Đường cong ROC có độ nhạy > 75,0%, độ đặc hiệu > 85,0% ở cả 4 loại aflatoxin B1, B2, G1, G2; Cả 4 loại aflatoxin B1, B2, G1, G2 có đường cong

ROC nằm phía trên góc phân giác góc $\frac{1}{4}$ thứ nhất.

3.2.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền

3.2.2.1. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền



Hình 3.12. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin trong các mẫu thuốc cổ truyền

Tỷ lệ nhiễm aflatoxin chung trong các mẫu thuốc cổ truyền là 9,41%(16/170).

**Bảng 3.15. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin
theo số loại aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền (n =16)**

Số loại độc tố	Số lượng	Tỷ lệ (%)
1 loại	9	56,25
2 loại	5	31,25
3 loại	2	12,50
Tổng	16	100

Trong số 16 mẫu nhiễm aflatoxin, có 9 mẫu nhiễm 1 loại aflatoxin (56,25%); 5 mẫu nhiễm 02 loại aflatoxin, 2 mẫu nhiễm 3 loại aflatoxin. Tổng cộng có 25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin.

3.2.2.2. Tỷ lệ nhiễm từng loại aflatoxin

- Tỷ lệ lượt mẫu nhiễm aflatoxin trong 170 vị thuốc xét nghiệm

Bảng 3.16. Tỷ lệ nhiễm từng loại aflatoxin G1, G2, B1, B2 ở các mẫu thuốc cổ truyền (n =170)

Loại aflatoxin nhiễm	Tình trạng nhiễm aflatoxin		
	Số mẫu xét nghiệm	Số lượt mẫu (+)	Tỷ lệ (%)
Số mẫu nhiễm G1	170	6	3,53
Số mẫu nhiễm G2	170	3	1,76
Số mẫu nhiễm B1	170	4	2,35
Số mẫu nhiễm B2	170	12	7,06
Tổng số	170	25	14,71

Tỷ lệ lượt mẫu nhiễm aflatoxin chung là 14,71%(25/170), trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm B2 cao nhất 7,06%(12/170), tiếp đến là tỷ lệ mẫu nhiễm G1 chiếm 3,53%(6/170), thấp nhất là mẫu nhiễm G2 (1,76%; 3/170).

- Tỷ lệ lượt mẫu nhiễm trong 25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin

Bảng 3.17. Tỷ lệ nhiễm từng loại aflatoxin G1, G2, B1, B2 ở các mẫu thuốc cổ truyền (n = 25)

Loại aflatoxin nhiễm	Tình trạng nhiễm aflatoxin		
	Số lượt mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	Giá trị p
Số mẫu nhiễm G1 (1)	6	24,0	$P_{(1;2,3,4)} < 0,05$ (0,047)
Số mẫu nhiễm G2 (2)	3	12,0	
Số mẫu nhiễm B1 (3)	4	16,0	
Số mẫu nhiễm B2 (4)	12	48,0	
Tổng số	25	100	

Tỷ lệ nhiễm aflatoxin B2 cao nhất 48,0% (12/25), khác biệt có ý nghĩa thống kê tỷ lệ nhiễm aflatoxin B2 so với G1, G2 và B1, $p < 0,05$.

Bảng 3.18. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm và không nhiễm nấm

Nhiễm nấm	Tình trạng nhiễm aflatoxin			Giá trị p
	Số lượng	Số mẫu (+) với aflatoxin	Tỷ lệ (%)	
Có nhiễm nấm (1)	56	11	19,64	$p_{(1;2)} < 0,01$ (0,004)
Không nhiễm nấm (2)	114	5	4,39	
Tổng	170	16	9,41	

Tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin chung là 9,41%(16/170). Khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm và không nhiễm nấm với tỷ lệ 19,64%(11/56) so với 4,39%(5/114), $p < 0,01$

Bảng 3.19. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở mẫu thuốc theo các bộ phận

Vị thuốc	Tình trạng nhiễm aflatoxin			Giá trị p
	Số mẫu XN	Số mẫu (+)	Tỷ lệ (%)	
Rễ (1)	67	7	10,45	$p_{(1;2,3,4)} > 0,05$ (0,661)
Thân (2)	38	2	5,26	
Cành, lá, hoa, quả (3)	53	5	9,43	
Khác (4)	12	2	16,67	
Tổng	170	16	100,0	

Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc theo các bộ phận rễ, thân, cành lá hoa với các tỷ lệ tương ứng là 10,45%, 5,26%, 9,43%, 16,67%, tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê $p > 0,05$.

3.2.3. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin

Bảng phương pháp phân tích tỷ suất chênh OR95%CI: giữa các yếu tố nhiễm nấm chung, nhiễm nấm ở thuốc nam và thuốc bắc, nhiễm nấm ở các rễ, thân, cành lá...với tình trạng nhiễm aflatoxin để tìm ra các yếu tố liên quan, kết quả như sau:

Bảng 3.20. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin

Nhiễm nấm	Tình trạng nhiễm aflatoxin			OR (CI 95%)	Giá trị p
	Nhiễm aflatoxin	Không nhiễm aflatoxin	Tổng		
Có nhiễm nấm	11	45	56	5,165 (1,69-15,70)	0,004
Không nhiễm nấm	5	109	114		
Tổng	16	114	170		

Có liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền với OR = 5,165, 95%CI: 1,69 -15,70, $p < 0,01$.

Mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 5,165 lần mẫu thuốc cổ truyền không nhiễm nấm.

Bảng 3.21. Liên quan giữa nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm *Aspergillus*

Nhiễm nấm	Tình trạng nhiễm aflatoxin			OR (CI 95%)	Giá trị p
	Nhiễm aflatoxin	Không nhiễm aflatoxin	Tổng		
Có nhiễm nấm	6	18	24	4,533 (1,47-13,97)	0,013
Không nhiễm nấm	10	136	146		
Tổng	16	154	170		

Có liên quan giữa nhiễm nấm *Aspergillus* và nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền với OR = 4,533, 95%CI: 1,47 -13,97, $p < 0,05$.

Mẫu thuốc cổ truyền nhiễm *Aspergillus* có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 4,533 lần mẫu thuốc cổ truyền không nhiễm *Aspergillus*.

**Bảng 3.22. Liên quan giữa nhiễm các loài nấm khác
với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền**

Nhiễm nấm	Tình trạng nhiễm aflatoxin			OR (CI 95%)	Giá trị p
	Nhiễm aflatoxin	Không nhiễm aflatoxin	Tổng		
Có nhiễm nấm	8	27	35	4,704 (1,623-13,636)	0,006
Không nhiễm nấm	8	127	135		
Tổng	16	154	170		

Có liên quan giữa nhiễm các loài nấm khác với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền OR = 4,704, 95%CI: 1,623 -13,636, $p < 0,01$.

Mẫu thuốc cổ truyền nhiễm các loài nấm có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 4,704 lần mẫu thuốc cổ truyền không nhiễm nấm.

**Bảng 3.23. Liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin
ở các mẫu thuốc nam và thuốc bắc**

Nhiễm nấm	Tình trạng nhiễm aflatoxin			OR (CI 95%)	Giá trị p
	Nhiễm aflatoxin	Không nhiễm aflatoxin	Tổng		
Thuốc bắc	14	75	89	7,373 (1,621-33,542)	0,003
Thuốc nam	2	79	81		
Tổng	16	154	170		

Có liên quan giữa nhiễm nấm với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền là thuốc bắc OR = 7,373, 95%CI: 1,621 -33,542, $p < 0,01$.

Mẫu thuốc cổ truyền là thuốc bắc nhiễm có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 7,373 lần mẫu thuốc cổ truyền là thuốc nam.

3.2.4. Độ thu hồi aflatoxin trong các mẫu xét nghiệm phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

170 mẫu thuốc cổ truyền đều được thực hiện kỹ thuật thu hồi aflatoxin phục vụ kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, kết quả như sau:

Bảng 3.24. Độ thu hồi xét nghiệm định lượng hàm lượng aflatoxin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ở các mẫu nhiễm nấm

TT	Tên vị thuốc	Độ thu hồi (%) với các aflatoxin			
		G2	G1	B2	B1
1	Bạch giới tử	65,98	86,83	95,25	89,85
2	Bạch mao căn	65,21	72,09	72,94	72,95
3	Bạch thược	73,79	85,16	88,29	94,17
4	Bán hạ	85,18	89,20	80,81	94,86
5	Bình lang	42,60	109,91	70,42	81,86
6	Cam thảo	76,03	79,58	91,65	107,88
7	Cát cánh	61,33	61,86	60,80	63,57
8	Củ gai	40,07	41,06	41,30	38,79
9	Chỉ xác	32,68	63,74	62,92	81,29
10	Đại táo	69,78	95,97	77,27	84,70
11	Đảng sâm	38,54	51,31	90,08	56,45
12	Địa long	54,52	83,88	244,79	69,31
13	Đinh hương	11,62	101,57	50,65	92,96
14	Đỗ trọng	47,90	83,66	54,44	96,08
15	Độc hoạt	30,43	63,81	39,30	93,70
16	Đương quy	34,39	125,29	77,08	91,91
17	Hạnh nhân	45,69	126,01	99,00	110,74
18	Hoàng kỳ	44,46	106,53	98,58	107,01
19	Hoắc hương	27,94	103,67	83,64	86,03
20	Hồng hoa	55,51	102,55	96,48	100,38
21	Huyền sâm	69,96	114,00	100,28	115,39
22	Kha tử	19,35	88,78	81,41	81,17

23	Liên tâm	39,88	113,91	104,75	117,87
24	Mẫu đơn bì	96,50	117,39	100,18	116,54
25	Mộc thông	26,35	92,44	90,33	104,26
26	Mộc dược	22,15	101,27	82,26	86,17
27	Ngưu bàng tử	69,87	112,78	98,82	113,50
28	Ngưu tất	84,68	116,87	102,87	123,59
29	Nhân trần	62,50	100,06	93,73	94,03
30	Ô tặc cốt	92,50	106,75	104,14	105,53
31	Phục thần	96,64	112,50	101,03	109,91
32	Sa sâm	102,68	123,89	109,01	124,00
33	Tang bì	45,87	89,90	54,67	72,83
34	Tần giao	93,49	122,02	105,39	125,13
35	Tiền hồ	108,14	94,48	109,51	125,15
36	Tỳ giải	85,16	84,69	85,00	73,63
37	Thạch xương bồ	45,83	79,54	98,44	121,52
38	Thông thảo	49,83	122,63	115,77	126,05
39	Thuyền thoái	98,36	119,11	102,15	125,79
40	Thương truật	96,13	118,93	107,01	122,87
41	Trinh nữ	69,77	90,65	76,22	109,89
42	Xạ cam	27,28	95,76	102,51	103,45
43	Xa tiền tử	89,93	108,42	98,44	103,29
44	Nấm linh chi	74,89	99,36	99,10	94,27
45	Đảng sâm	11,30	97,94	53,73	95,18
46	Hoài sơn	87,31	111,53	109,85	111,37
47	Lá dung	62,40	112,74	105,92	100,11
48	Liên nhục	87,21	104,81	107,13	105,31

49	Ngũ gia bì	83,60	94,27	102,44	101,77
50	Xích thược	87,91	108,20	110,03	107,18
51	Tang ký sinh	79,91	89,44	81,64	85,46
52	Tân di	30,36	113,97	99,44	96,82
53	Chi tử	71,32	91,46	94,39	99,40
54	Thiên hoa phấn	67,66	121,77	108,94	118,28
55	Thạch mộc	63,77	78,91	78,17	79,78

Ghi chú: Tham khảo AOAC với mức nồng độ spike thêm vào mẫu, % tìm lại nên nằm trong khoảng 50-120%

Hầu hết các mẫu xét nghiệm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng máy HPLC có độ thu hồi tốt với các loại aflatoxin B1, B2, G1 từ 50% đến 100,0%. Riêng với G2 ở một số mẫu có độ thu hồi thấp là: Đẳng tâm, mộc thông, đinh hương.

Bảng 3.25. Tổng hợp tỷ lệ thu hồi từng loại aflatoxin bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao ở các mẫu thuốc nhiễm nấm

Loại aflatoxin cần thu hồi	Số lượng, tỷ lệ (%) mẫu thu hồi aflatoxin dưới 50%	Số lượng, tỷ lệ (%) mẫu thu hồi aflatoxin được trên 50%
G1 (1)	01 (1,82)	54 (98,18)
G2 (2)	21 (38,18)	34 (61,82)
B1 (3)	01 (1,82)	54 (98,18)
B2 (4)	02 (3,64)	53 (96,36)
Chung	25 (11,36)	195 (88,64)

Tỷ lệ thu hồi trên 50% của 4 loại aflatoxin chiếm 88,64%(195/220), thu hồi được dưới 50% chỉ chiếm 11,36%(25/220).

Bảng 3.26. Kết quả tổng hợp xét nghiệm định lượng hàm lượng aflatoxin

TT	Tên thuốc	Định lượng loại aflatoxin nhiễm (ng/g)			
I. Các mẫu thuốc nhiễm nấm		G2	G1	B2	B1
1	Địa long	0	0	0,0729	0
2	Đinh hương	0	0	0,0243	0
3	Đỗ trọng	0	0	1,3666	0
4	Độc hoạt	0	5,4588	2,7686	0
5	Mẫu đơn bì	0	2,0501	0	0
6	Mộc dược	0	0	0,2420	2,4646
7	Tiền hồ	0	2,2170	0	0
8	Thạch xương bồ	0,3164	1,0756	0,1389	0
9	Xa tiền tử	0	0	0,1255	0
10	Đẳng sâm	0	0	0,0594	0
11	Tân di	0	0	0,0657	0
12	Chi tử	0	0,9266	0,1191	1,6933
13	Thiên hoa phấn	0	0	0,0595	0
II. Các mẫu thuốc không nhiễm nấm (6/115)					
TT	Tên vị thuốc	Định lượng loại aflatoxin nhiễm (ng/g)			
		G2	G1	B2	B1
14	Đại táo	0	0	0	2,4145
15	Đan sâm	0	0	2,4641	0
16	Địa long	0,3164	0	0	0
17	Đinh hương	0,2487	0	0	0
18	Đỗ trọng	0	0,5429	0	0
19	Đương quy	0	0	0	2,9646

Với 13 mẫu nhiễm aflatoxin ở các vị thuốc cổ truyền nhiễm nấm và 06 mẫu nhiễm aflatoxin ở các vị thuốc cổ truyền nhiễm nấm mốc, tổng số có có

25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin, trong đó: 15 mẫu nhiễm 1 loại aflatoxin; 02 mẫu nhiễm 2 loại aflatoxin; 02 mẫu nhiễm 3 loại aflatoxin.

Bảng 3.27. Hàm lượng độc tố trong các mẫu nhiễm aflatoxin

Loại aflatoxin	Số lượng	Nhỏ nhất Minimum (ng/g)	Lớn nhất Maximum (ng/g)	Mean (ng/g)	Std. Deviation
G2	3	0,25	0,32	0,2938	0,03909
G1	6	0,54	5,46	2,0452	1,79613
B2	12	0,02	2,77	0,6256	1,00154
B1	4	1,69	2,96	2,3843	0,52332
Tổng	25	0,06	8,23	1,8873	2,0262

Hàm lượng aflatoxin trung bình 1,89 (ng/g), cao nhất là hàm lượng B1 (2,38 ng/g), sau đó là G1 (2,05 ng/g), 2 loại aflatoxin khác hàm lượng thấp.

Bảng 3.28. Hàm lượng aflatoxin ở mẫu nhiễm nấm và không nhiễm nấm

Nhiễm nấm	Số lượng	Mean (ng/g)	SD(ng/g)	Giá trị p
Có (1)	19	1,55	1,15	$p_{(1;2)} > 0,05$ (0,347)
Không (2)	6	2,62	3,33	

Hàm lượng aflatoxin trung bình ở mẫu nhiễm nấm và không nhiễm nấm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3.29. Hàm lượng aflatoxin ở mẫu thuốc bắc và thuốc nam

Thuốc đông dược	Số lượng	Mean (ng/g)	SD (ng/g)	Giá trị p
Thuốc bắc (1)	19	2,02	2,13	$p_{(1;2)} > 0,05$ (0,508)
Thuốc nam (2)	6	0,96	0,81	

Hàm lượng aflatoxin trung bình ở mẫu nhiễm nấm và không nhiễm nấm khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê.

3.2.5. Tỷ lệ các mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT

Kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao ở 170 mẫu thuốc cổ truyền đã xác định 16 mẫu nhiễm aflatoxin, với 25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin, kết quả như bảng 3.30 sau:

Bảng 3.30. Tỷ lệ mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT (n = 16)

Tình trạng nhiễm aflatoxin					
Số mẫu có hàm lượng aflatoxin < 0,5 ppb	Tỷ lệ (%)	Số mẫu có hàm lượng aflatoxin ≥ 0,5 ppb	Tỷ lệ (%)	Số mẫu có hàm lượng aflatoxin ≥ 30 ppb	Tỷ lệ (%)
11	44,0	14	56,0	0	0,0

Có 56,0% mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt 0,5 bpp, không có mẫu nào vượt ≥ 30 bpp (0,0%).

Bảng 3.31. Liên quan giữa nhiễm nấm ở các vị thuốc cổ truyền với nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn

Nhiễm nấm	Nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn cho phép (> 0,05 ppb)			OR (CI 95%)	Giá trị p
	Số mẫu ≥ 0,05 ppb	Số mẫu < 0,05ppb	Tổng		
Có	7	49	56	5,286 (1,312 - 21,299)	0,016
Không	3	111	114		
Tổng	10	160	170		

Có liên quan giữa nhiễm nấm với nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn cho phép với OR = 5,268, 95%CI:1,312 - 21,299, p < 0,05. Mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm có nguy cơ nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn cho phép cao gấp 5,286 lần mẫu không nhiễm nấm.

3.3. Kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu bảo quản thuốc cổ truyền

3.3.1. Trang thiết bị bảo quản thuốc và điều kiện vi khí hậu kho thuốc trước và sau can thiệp

- Bằng sự đầu tư từ nguồn vốn tự chủ của Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An cho 2 kho bảo quản thuốc, danh mục trang bị gồm quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm; hộp hút ẩm, máy đo nhiệt độ và độ ẩm, máy đo tốc độ gió...

- Cải tạo rãnh thoát nước quanh nhà kho, sơn lại tường nhà kho bằng sơn chống thấm. Bổ sung mái chống nóng cho kho thuốc. Thay cửa 2 kho bằng cửa khung nhôm, vách kính màu, cửa có roăng cao su khít, kín. Trang bị các túi hút ẩm ở tất cả các hộp đựng thuốc, nhãn của các hộp đựng thuốc, giá để thuốc.

- Bệnh viện đã tổ chức các đợt kiểm tra định kỳ 1 lần/1 tháng, nội dung kiểm tra mọi khâu nhập, bảo quản và phân phối thuốc đông dược trước khi sử dụng cho người bệnh, giấy xác nhận an toàn sinh học của đơn vị cung cấp thuốc. Thành phần đoàn kiểm tra gồm: Đại diện lãnh đạo Bệnh viện, phòng kế hoạch, phòng chất lượng bệnh viện, khoa dược và các cán bộ kho thuốc. Kết quả lắp đặt và kiểm tra định kỳ chất lượng thuốc như sau:

Bảng 3.32. Trang thiết bị lắp đặt cho 1 nhà kho trước và sau can thiệp

Loại thiết bị	Trước can thiệp		Sau can thiệp	
	Số lượng	Đánh giá	Số lượng	Đánh giá
Quạt thông gió	01	Không đạt	04	Đạt
Máy điều hòa nhiệt độ	0	Không đạt	02	Đạt
Máy hút ẩm	0	Không đạt	02	Đạt
Hộp hút ẩm to	0	Không đạt	04	Đạt
Túi hút ẩm ở hộp thuốc	0	Không có	85	Đạt
Máy đo nhiệt độ, ẩm độ	02	Không đạt	04	Đạt

Trước can thiệp các kho đều thiếu các thiết bị cơ bản bảo quản thuốc như quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm; hộp hút ẩm, máy đo nhiệt độ và độ ẩm cả 2 kho đều không đạt tiêu chuẩn. Sau can thiệp các trang thiết bị được đầu tư lắp đặt cả hai kho đều đạt các tiêu chuẩn bảo quản thuốc.

**Bảng 3.33. Kết quả kiểm tra định kỳ kho thuốc
và chất lượng thuốc sau can thiệp**

Nội dung kiểm tra kho thuốc	Số đợt kiểm tra	Kết quả đánh giá đạt	Kết quả đánh giá không đạt	Đánh giá chung
Nhiệt độ (< 25°C)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Độ ẩm (< 70%)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Tốc độ gió (từ 0,5 -1m/s)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Chiếu sáng (≥120 Lux)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Máy hút ẩm (đạt/không đạt 2 máy/kho)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Hộp đựng thuốc (>85 hộp)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Túi hút ẩm ở hộp thuốc (> 85)	12	12/12	0/12	Đạt yêu cầu
Nền, tường, cửa nhà kho..	12	2/12	0/12	Đạt yêu cầu
Kích thước từ nền kho đến nơi để thuốc	12	2/12	0/12	Đạt yêu cầu
Hồ sơ nhập thuốc	12	2/12	0/12	Đạt yêu cầu
Phiếu kiểm định an toàn sinh học của nhà cung cấp thuốc	12	2/12	0/12	Đạt yêu cầu
Biên bản kiểm định khi nhập thuốc vào kho	12	2/12	0/12	Đạt yêu cầu
Quy trình kỹ thuật kho thuốc				

Sau can thiệp lắp đặt các trang thiết bị cải thiện điều kiện vi khí hậu cho 2 kho thuốc và tăng cường 12 đợt kiểm tra định kỳ toàn bộ hoạt động của cán bộ nhân viên kho thuốc, kết quả cả 2 kho đều đạt yêu cầu thực hành tốt bảo quản thuốc và an toàn cho 2 kho thuốc.

Kết quả đánh giá chung như bảng 3.33 sau:

Bảng 3.34. Thay đổi các yếu tố vi khí hậu trong kho thuốc số 1 sau 12 tháng

Thời gian đánh giá	Đặc điểm nhà kho và thiết bị bảo quản thuốc đông được	Kết quả trung bình	Tiêu chuẩn cho phép	Đánh giá
Trước can thiệp	- Nhiệt độ trung bình ở 5 vị trí, 4 góc kho và trung tâm kho (t°)	27°C ± 3,1°C	< 25°C	Không đạt
	- Độ ẩm tương đối (%)	75,91% ± 4,6%	< 70%	Không đạt
	- Tốc độ gió trung bình ở 5 vị trí 4 góc kho và trung tâm kho m/s	0,45 m/s ± 0,05m/s	0,5 - 1,0m/s	Không đạt
Sau can thiệp 12 tháng	- Nhiệt độ trung bình ở 5 vị trí, 4 góc kho và trung tâm kho (t°)	23,5°C ± 1,5°C	< 25°C	Đạt
	- Độ ẩm tương đối (%)	65,91% ± 3,6%	< 70%	Đạt
	- Tốc độ gió trung bình ở 5 vị trí 4 góc kho và trung tâm kho m/giây	0,75 m/s	0,5 -1,0 m/s	Đạt

Trước can thiệp kho số là 27°C ± 3,1°C (> 25°C), độ ẩm tương đối 75,91% ± 4,6% (> 70%), tốc độ gió 0,45 m/giây (< 0,5m/giây). Không đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc.

Sau can thiệp 12 tháng, kho số 1 đều có điều kiện nhiệt độ trung bình ở 4 góc kho và giữa kho là 23,5°C ± 1,5°C (< 25°C), độ ẩm tương đối 65,91% ±

3,6% (< 70%), tốc độ gió 0,75 m/s (trong khoảng 0,5m/giây đến 1 m/giây).

Cả hai kho đều đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc.

Bảng 3.35. Thay đổi các yếu tố vi khí hậu trong kho thuốc số 2 sau 12 tháng

Thời gian đánh giá	Đặc điểm nhà kho và thiết bị bảo quản thuốc cổ truyền	Kết quả trung bình	Tiêu chuẩn cho phép	Đánh giá
Trước can thiệp	- Nhiệt độ trung bình ở 5 vị trí, 4 góc kho và trung tâm kho (t°)	26°C ± 4,1°C	< 25°C	Không đạt
	- Độ ẩm tương đối (%)	77,15% ± 3,6%	< 70%	Không đạt
	- Tốc độ gió trung bình ở 5 vị trí 4 góc kho và trung tâm kho m/s	0,42 m/s ± 0,03m/s	0,5 - 1,0m/s	Không đạt
Sau can thiệp 12 tháng	- Nhiệt độ trung bình ở 5 vị trí, 4 góc kho và trung tâm kho (t°)	23,8°C ± 1,5°C	< 25°	Đạt
	- Độ ẩm tương đối (%)	66,01% ± 3,7%	< 70%	Đạt
	- Tốc độ gió trung bình ở 5 vị trí 4 góc kho và trung tâm kho m/giây	0,72 m/s	0,5 - 1,0m/s	Đạt

Trước can thiệp kho số 2 đều có nhiệt độ trung bình là 27°C ± 3,1°C (> 25°C), độ ẩm tương đối 75,91% ± 4,6% (> 70%), tốc độ gió là 0,45 m/giây (< 0,5m/giây), không đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc.

Sau can thiệp 12 tháng, kho số 2 đều có điều kiện vi khí hậu nhiệt độ trung bình là 23,5°C ± 1,5°C (< 25°C), độ ẩm tương đối 65,91% ± 3,6% (< 70%), tốc độ gió 0,75 m/giây (trong khoảng 0,5m/giây đến 1 m/giây). Đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc.

3.3.2. Tỷ lệ nhiễm nấm trước và sau can thiệp

- Tỷ lệ nhiễm nấm chung

170 vị thuốc cổ truyền có trong danh mục bảo hiểm chi trả đều được xét nghiệm nấm bằng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud, kết quả:

Bảng 3.36. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền trước và sau can thiệp 12 tháng tại 2 kho thuốc

Kho số	Trước can thiệp (1)			Sau can thiệp (2)			Giá trị p
	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	
Số 1	84	27	32,14	84	18	21,43	p _(1:2) < 0,05
Số 2	86	29	33,72	86	20	23,26	p _(1:2) < 0,05
Chung	170	56	32,94	170	38	22,35	p _(1:2) < 0,05
Chỉ sốHQ(%)	32,15%						

Tỷ lệ nhiễm nấm sau can thiệp 12 tháng đã giảm có ý nghĩa thống kê từ 32,94% xuống còn 22,35% với $p < 0,05$. Chỉ số hiệu quả can thiệp là 32,15%

Ở từng kho tỷ lệ nhiễm nấm giảm có ý nghĩa thống kê:

- + Kho số 1, từ 32,14% xuống 21,43%, $p < 0,05$;
- + Kho số 2, từ 33,72% xuống 23,26%, $p < 0,05$

- Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus*

Bảng 3.37. Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* trước và sau can thiệp ở các mẫu thuốc cổ truyền tại 2 kho

Kho số	Trước can thiệp (1)			Sau can thiệp (2)			Giá trị p
	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	
Số 1	84	11	13,10	84	5	5,95	$p_{(1:2)} < 0,05$
Số 2	86	13	15,11	86	6	6,98	$p_{(1:2)} < 0,05$
Chung	170	24	14,11	170	11	6,47	$p_{(1:2)} < 0,05$
Chỉ số HQ(%)	54,54						

Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* sau can thiệp 12 tháng đã giảm có ý nghĩa thống kê từ 14,11% xuống còn 6,47% với $p < 0,05$. Chỉ số hiệu quả là 53,55%

Ở từng kho tỷ lệ nhiễm nấm cũng giảm có ý nghĩa thống kê.

+ Kho số 1, giảm từ 13,10% xuống 5,95%, $p < 0,05$.

+ Kho số 2, giảm từ 15,11 xuống 6,47%, $p < 0,05$

- Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác trước và sau can thiệp 12 tháng

Bảng 3.38. Tỷ lệ nhiễm các loài nấm khác trước và sau can thiệp 12 tháng

Kho số	Trước can thiệp (1)			Sau can thiệp (2)			Giá trị p
	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	Số xét nghiệm	Số (+)	Tỷ lệ (%)	
Số 1	84	16	19,00	84	13	15,48	$p_{(1;2)} < 0,05$
Số 2	86	16	18,60	86	14	16,28	$p_{(1;2)} < 0,05$
Chung	170	32	18,82	170	27	15,88	$p_{(1;2)} < 0,05$
Chỉ số HQ (%)	15,62						

Tỷ lệ nhiễm nấm khác sau can thiệp 12 tháng đã giảm có ý nghĩa thống kê từ 18,82% xuống còn 15,88% với $p > 0,05$.

Chỉ số hiệu quả can thiệp là 15,62%.

Chương 4: BÀN LUẬN

4.1. Tỷ lệ, thành phần loài nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023

4.1.1. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền

Nấm sinh aflatoxin, ochatoxin... gây hư hỏng thực phẩm, hư hỏng và giảm chất lượng các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch, thực phẩm chế biến kể cả thuốc cổ truyền nếu điều kiện bảo quản không tốt. Đến nay, phương pháp chủ yếu phát hiện nhiễm nấm trên thế giới là nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud, xác định ô nhiễm nấm thông qua phát hiện độc tố nấm... Với 170 mẫu thuốc cổ truyền, trong đó có 89 mẫu thuốc bắc, 81 mẫu thuốc nam qua nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud có pH < 4,5 và kháng sinh, với các mẫu nuôi cấy (+) thực hiện kỹ thuật sinh học phân tử để định danh loài nấm.

Kết quả tại hình 3.1 cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền là 32,94% (56/170). Đến nay, tiêu chuẩn vàng để chẩn đoán nhiễm nấm là kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Sabouraud có kháng sinh và độ pH acid (< 4,5) với lý do phương pháp này có độ nhạy, độ đặc hiệu cao và được áp dụng trên toàn thế giới. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn nghiên cứu của các tác giả trong nước:

- Đặng Bích Thủy (2008), nghiên cứu tại Kiên Xương - Thái Bình về thực trạng nhiễm nấm và kiến thức, thái độ, thực hành của người dân về ô nhiễm nấm của các sản phẩm sau thu hoạch cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm ở lạc 13,3% và 24,4% [71].

- Phạm Thị Ngọc Lan (2012), khảo sát ô nhiễm thực phẩm trên địa bàn thành phố Huế, kết quả cho thấy: 11,1% mẫu nghiên cứu có ô nhiễm nấm, trong đó 13,6% mẫu kẹo, 19% mẫu tôm cá mực [90].

- Lý Thu Hương (2012), nghiên cứu tình trạng nhiễm nấm và ochratoxin

A trong đất và rễ cây trồng, kết quả cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus niger* và *Penicillium viridicatum* có khả năng sinh ochratoxin A là 43,75%, tỷ lệ nhiễm này thay đổi từ 11,1% đến 62,5% [42].

Nhưng thấp hơn kết quả nghiên cứu của các tác giả:

- Đâu Huy Hoàn (2018), cũng ở nghiên cứu 505 mẫu thuốc cổ truyền tại các bệnh viện tỉnh Nghệ An cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm bằng nuôi cấy trong môi trường Saboraud 51,8%, trong đó các mẫu thuốc bắc là 45,53%, thuốc nam 72,8%, tỷ lệ nấm sợi 92,0%, có 8,0% nấm men [47].

- Nguyễn Đình Nga (2012), nghiên cứu nhiễm nấm và aflatoxin trong một số dược liệu bán ở Quận 5 – Thành phố Hồ Chí Minh bằng định danh dựa vào khóa định loài nấm và định lượng aflatoxin bằng Kit ELISA, kết quả: 86/141(61,00%) mẫu dược liệu khảo sát có mức độ nhiễm nấm vượt ngưỡng 500 CPU/gam [14].

- Tại Tây Nguyên nghiên cứu của Nguyễn Vũ Thuận (2022), tại một số gia đình huyện Ea H'leo, Cư M' Gar, Kroong Pắc tỉnh Đắk Lắk kết quả có 48,7% mẫu ngô, lạc nhiễm nấm vượt tiêu chuẩn cho phép 500 CPU/gam [49]. Nguyễn Thị Xuân và CS (2022), nghiên cứu từ 32 chủng nấm được phân lập từ mẫu đất, ngô, lạc, đã xác định được 4 chủng có các gen *aflr*, *avfa*, *omtA* và *ver-1* có vai trò sinh aflatoxin [50]

- Tổ chức Nông Lương Thế giới (FAO), khoảng 50,0% sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch nhiễm nấm [26], [54].

Vấn đề ô nhiễm vi sinh vật trong thảo dược trầm trọng không chỉ ở Châu Á, mà cả ở Châu Mỹ và nhiều nơi trên thế giới. Năm 2020, Carolina Miranda de Sousa Limma và CS nghiên cứu tình trạng nhiễm vi sinh vật trong thảo dược, tác giả nhận thấy đối tượng sử dụng thảo dược nhiều nhất là người cao tuổi và đây cũng là đối tượng có nguy cơ cao nhất mắc các bệnh do vi sinh vật ký sinh trên thảo dược gây ra. Có 35,6% mẫu thảo dược có nhiễm nấm, 51,5% có nhiễm

vi khuẩn, tổng số có 31,8% mẫu thảo dược có mức vượt ngưỡng an toàn ($> 10^5$ CFU/gram), có 31,5% mẫu thảo dược không đủ điều kiện bảo quản.

Trong nghiên cứu của chúng tôi tại bảng 3.2 cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc bắc cao hơn các vị thuốc nam. Cụ thể tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc nam là 28,4 % ở các mẫu thuốc bắc 37,1%, tuy nhiên sự khác biệt này chưa có ý nghĩa thống kê, với $p > 0,05$. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với thực tiễn về cách chế biến và bảo quản các thuốc là khác nhau. Với các mẫu thuốc bắc đa số được sao, tẩm bằng đường và các chất bảo quản khác nên giàu dinh dưỡng hơn, nếu trong điều kiện khí hậu nóng ẩm dễ bị nhiễm nấm mốc. Mặt khác các mẫu thuốc bắc thương qua nhiều khâu trung gian như vận chuyển, nhập khẩu, về kho bảo quản của công ty, rồi mới tiến hành các thủ tục đấu thầu, phân phối, không kể các lỗ hổng về mặt quản lý chất lượng thuốc qua nhiều khâu trung gian.

Các nhà khoa học cùng thống nhất nhận định các yếu tố liên quan đến tình trạng nhiễm nấm trong lương thực, thực phẩm là: Chất liệu bao gói bảo quản các sản phẩm sau thu hoạch, kể cả các sản phẩm thuốc cổ truyền bằng chất liệu gì? Có đảm bảo kín, không chế độ ẩm, nhiệt độ, ngăn không cho bào tử nấm xâm nhập hay không. Các chất bảo quản các sản phẩm sau thu hoạch như các sản phẩm thuốc cổ truyền, về nguyên tắc không được phép sử dụng các hóa chất bảo quản, chỉ sao khô, bao gói kín... nhưng trong thực tế nhiều nhà thuốc sử dụng hơi lưu huỳnh ở dạng xông khói nhằm tiêu diệt các mầm bệnh và nấm. Đây là một hóa chất độc có hại cho sức khỏe con người. Ngoài ra các yếu tố về điều kiện canh tác và hóa chất bảo vệ thực vật...không tốt cũng làm cho nấm mốc phát triển ở các mẫu thuốc cổ truyền.

Như chúng ta đã biết nấm phát tán các bào tử lan truyền trong không khí, khi rơi vào các giá thể hoặc vật chủ mới nếu gặp điều kiện thuận lợi như: Độ ẩm tương đối cao $> 70\%$; Nhiệt độ $> 25^{\circ}\text{C}$; Tốc độ gió thấp $< 0,5\text{m/s}$ hoặc > 1

m/s, dinh dưỡng phù hợp các bào tử nấm nhanh chóng phát triển thành sợi nấm hoặc sợi nấm. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm nấm trong các vị thuốc cổ truyền của nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn năm 2018 tại Nghệ An 51,8% so với 32,35% của nghiên cứu này, riêng tại Bệnh viện Y học cổ truyền tỉnh Nghệ An kết quả trong nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn là 48,53% cũng cao hơn so với nghiên cứu này (32,35%). Kết quả này cho thấy sau 7 năm Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An áp dụng các biện pháp nâng cao chất lượng bảo quản thuốc cổ truyền như:

- Nâng cấp, bổ sung hệ thống nhà kho bảo quản thuốc đạt các tiêu chuẩn về thông gió, độ ẩm, nhiệt độ (100% kho chứa thuốc có diện tích > 50 m²; Mái, nền, tường nhà kho kiên cố; có hệ thống thoát nước, thông gió.

- Đảm bảo có đầy đủ giá để thuốc, hộp đựng thuốc kín có ghi nhãn đầy đủ; giữa các hộp đựng các mẫu thuốc có ngăn riêng. Mỗi ngăn đựng thuốc có hộp hút ẩm chuyên dụng.

- Đảm bảo các điều kiện nhiệt độ trung bình ở 4 góc và trung tâm kho thuốc < 25°C; Độ ẩm tương đối luôn luôn < 70%; Tốc độ gió trong khoảng 0,5 – 1m/giây.

Với những đầu tư đầy đủ và bài bản trên góp phần cải thiện môi trường vi khí hậu hạn chế tối đa nấm mốc phát triển, vì vậy tỷ lệ nhiễm nấm tại cùng Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An giảm mạnh là hoàn toàn hợp lý.

Mặt khác, trước năm 2020 hầu hết các loại thuốc cổ truyền đều đầu thầu ở dạng thành phẩm nên qua nhiều khâu như: Sản xuất, vận chuyển, bảo quản tại các kho của nhà phân phối...thì có một lượng không nhỏ vị thuốc cổ truyền nhiễm nấm. Để nâng cao chất lượng thuốc phục vụ người bệnh tốt hơn, giảm giá thành tránh các khâu trung gian vận chuyển và bảo quản Bệnh viện đã phát triển mạnh khoa dược, chỉ mua nguyên liệu thô về chế biến tại Bệnh viện phục vụ ngay nhu cầu sử dụng của người bệnh ít phải qua các khâu trung gian đã làm

giảm đáng kể tỷ lệ nhiễm nấm là hoàn toàn hợp lý. Mặt khác, một số vị thuốc cổ truyền phải đấu thầu thì nhà cung cấp phải có giấy xác nhận đảm bảo an toàn sinh học, tức là có chứng nhận thực hành thuốc tốt theo quy định của Bộ Y tế.

Các nhà khoa học đã xác nhận mỗi loài nấm có khả năng sinh một hoặc nhiều độc tố khác nhau. Các nhà khoa học đã xác định có trên 18 loài *Aspergillus* có khả năng sinh độc tố aflatoxin trong đó vài trò nổi bật của *A. flavus* và *A. parassiticus*, *A. niger* các độc tố phổ biến nhất là B1, B2, G1 và G2. *Fusarium* sinh độc tố fumonisin...

Nấm ký sinh gây bệnh chủ yếu ở thực vật, lương thực, thực phẩm, một số loài gây bệnh trực tiếp cho con người, nhưng thường gây bệnh gián tiếp qua các độc tố của nấm như các độc tố aflatoxin, ochatoxin, fumonisin. Mặt khác, cùng 1 loài nấm ở những điều kiện khác nhau lại sinh ra loại độc tố khác nhau, như aflatoxin B1 chủ yếu do nấm *Aspergillus* spp tạo ra trong điều kiện 28°C - 30°C. Dựa vào đặc điểm sinh độc tố đặc trưng cho từng loài nấm nêu trên các nhà khoa học xác định tỷ lệ nhiễm nấm trong các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch, như sữa, bơ, kẹo, củ quả, hạt...bằng xác định sự có mặt của các độc chất là sản phẩm của nấm ký sinh tại vật chủ như: aflatoxin, ochartoxin A, fumonisins....các kỹ thuật đã áp dụng như: kỹ thuật miễn dịch (ELISA), kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, kỹ thuật hóa học miễn dịch xúc tác... Việc xác định tỷ lệ nhiễm nấm thông qua độc tố nấm có rất nhiều hạn chế không chính xác, không phản ánh hết tỷ lệ nhiễm nấm vì lý do sau: Nhiều loài nấm không sinh độc tố bất lợi cho sức khỏe con người; Các kỹ thuật phát hiện gián tiếp độc tố nấm chủ yếu tập trung vào các độc chất có hại cho sức khỏe con người mà bỏ qua các chất không gây hại cho sức khỏe con người từ đó bỏ sót một tỷ lệ lớn nhiễm nấm. Trên thế giới có nhiều kỹ thuật xác định nhiễm nấm thông qua phát hiện độc tố nấm như: Nghiên cứu tại Brazil của Fabiana Aparecida Couto (2014), về sự đa dạng quần thể nấm dạng sợi trong các hạt cà

phê trồng theo cách truyền thống và hữu cơ, kết quả: Từ 18 mẫu cà phê đã phân lập được 346 chủng nấm, với 32 loài, 12 chi gồm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*

Các sản phẩm chuyển hóa khi nấm ký sinh đa số có hại cho sức khỏe, là căn nguyên gây nhiễm độc tế bào gan, thận, máu và gây ung thư cho các cơ quan nội tạng. Tuy nhiên cũng có một số giống nấm khi ký sinh và phát triển trong môi trường phù hợp đã sinh ra các chất có lợi cho sức khỏe con người như: Nấm *Penicillium* sinh ra kháng sinh *Penicilline*, nhiều loài nấm sợi như *Monascus*, *Mucor*, *Rhizopus* và *Zygomonas* được sử dụng để lên men các sản phẩm sữa, đậu nành...Tuy nhiên trong một giống nấm vừa có lợi vừa có hại cho sức khỏe con người như: Một số loài nấm *Penicilium* spp có khả năng sinh *Penicilline* là kháng sinh sử dụng điều trị nhiễm trùng trong y tế nhưng cũng có khả năng sinh aflatoxin A là chất độc gây ung thư, bao gồm *Penicilium viridicatum*, *Penicilium verrucosum*, *Penicilium chrysogenum*, *Penicilium commune*, *Penicilium cyclopium*, *Penicilium palitans*, *Penicilium variable*, tuy nhiên hàm lượng aflatoxin tạo ra không lớn [56], [57]. Việc một giống nấm sinh các sản phẩm chuyển hóa có lợi hay có hại cho sức khỏe con người ngoài phụ thuộc loài nấm mà còn phụ thuộc vào môi trường cụ thể mà nấm phát triển như nhiệt độ, độ ẩm, dinh dưỡng...

Kết quả tại bảng 3.3, cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền có nguồn gốc từ rễ cao nhất (40,30%), tỷ lệ nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền làm từ thân cây là thấp nhất (23,68%). Điều này hoàn toàn phù hợp với thực tế các mẫu thuốc cổ truyền làm từ rễ sau thu hoạch nếu không bảo quản tốt rất dễ bị hỏng, vì rễ tồn tại lâu trong đất có thể đã nhiễm nấm từ trước và rễ có độ ẩm cao, các chất dinh dưỡng nhiều, hàm lượng tinh bột cao...đây chính là môi trường thuận lợi cho nấm phát triển.

Với 56 mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm, trong đó 50 mẫu (89,29%)

nhiễm 01 loại nấm, nhiễm 2 loại nấm 5/56(8,93%), nhiễm 3 loại nấm 1/56(1,79%). Tổng số chủng nấm là 63, trong đó có: *Aspergillus* là 28(44,44%), *Rhizopus* 16(25,40%), *Penicillium* là 13(20,63%), *Fusarium* là 4(6,35%), *Phoma* spp và *Cladosporidium* là 1 (1,59%) mỗi loại.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn (2018), cũng nghiên cứu thực trạng nhiễm nấm ở các vị thuốc cổ truyền: Tỷ lệ nấm sợi 92,0%, nấm men 8,0% [47]. Đậu Huy Hoàn có kết luận khác biệt với nghiên cứu này về tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc nam cao hơn các vị thuốc bắc. Trong nghiên cứu này tỷ lệ nhiễm nấm chung 32,9% ở các vị thuốc nam 28,4 % ở các vị thuốc bắc 37,1%, nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc nam là 72,8%, thuốc bắc là 45,53% [47]

Kết quả tại bảng 3.4 cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc cổ truyền có nguồn gốc từ rễ cao nhất (40,30%), thân thấp nhất (23,68%). Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc làm từ rễ, thân, cành – lá- hoa – quả khác biệt chưa có ý nghĩa thống kê với các tỷ lệ 40,3% so với 23,68%, 32,08%, 35,0%, $p > 0,05$. Kết quả này cũng khác biệt với nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn, tỷ lệ nhiễm nấm ở hoa quả và thân lá thấp hơn tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc làm từ rễ, trong ở nghiên cứu này tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc làm từ rễ là 40,3% cao hơn các vị thuốc làm từ thân, cành – lá- hoa – quả. Trong nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn có tỷ lệ nhiễm nấm ở hoa quả là 67,55, ở thân lá 69,09% ở củ 86,67%. Như chúng ta đã biết các vị thuốc làm từ rễ có nhiều chất dinh dưỡng hơn, độ ẩm tồn tại trong củ cao hơn, dễ hút ẩm nếu xấy không kỹ và củ là môi trường thuận lợi hơn cho nấm phát triển ở hoa, lá, thân [47]

4.1.2. Thành phần loài nấm

Đề tài này cũng sử dụng kỹ thuật nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud và định danh loài nấm bằng hình thái học, kết quả tại bảng 3.5, cho thấy với 56 mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm, trong đó: 50 mẫu nhiễm một loài nấm, 2 mẫu nhiễm phối hợp hai loại *Aspergillus*, 03 mẫu nhiễm phối hợp

Aspergillus và *Penicillium*, 01 mẫu nhiễm 03 loài *Aspergillus* khác nhau. Như vậy đã xác định được 63 chủng, trong đó có: *Aspergillus* là 28(44,44%), *Rhizopus* 16(25,40%), *Penicillium* là 13(20,63%), *Fusarium* là 4(6,35%), *Phoma* spp và *Cladosporidium* là 1 (1,59%) mỗi loại. Kết quả này cho thấy sự đa dạng về thành phần loài nấm ô nhiễm trong các vị thuốc cổ truyền.

Các mẫu nấm được tách chiết ADN bằng bộ kit Fungi/Yeast Genomic DNA Isolation Kit (Cat. # 27300, Norgen Biotek Corp, Canada) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA của nấm sau khi tách chiết được sử dụng làm khuôn (template) cho phản ứng PCR. Cặp mồi ITS5 và NL4 khuếch đại đoạn gen chứa 1 phần gen 18S rDNA; Toàn bộ đoạn gen 5.8S rDNA; Toàn bộ các đoạn giao gen ITS1, ITS2 và một phần gen 28S rDNA của vi nấm, kích thước khoảng 1000-1200bp, tùy từng loài nấm. Sau khi nhân bội gen, chạy điện di, sản phẩm PCR tinh sạch được kiểm định so sánh với ngân hàng genbank chuẩn quốc tế là các chủng chuẩn đã được đăng ký mã số trên ngân hàng genbank quốc tế với sự kiểm định của các labo có uy tín trên thế giới. Trong đề tài này chúng tôi sử dụng mã số genbank KF617362.1. Hình ảnh chạy điện di trên gel thạch agarose 2,0% có kết quả là các băng sáng rõ nét, kích thước xấp xỉ 900 bp, đúng với giá trị kích thước của các đoạn gen ITS1, ITS2 chuẩn trong ngân hàng gen banks quốc tế.

Bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự gen kết quả tại các bảng 3.7, bảng 3.8 và bảng 3.9 của đề tài đã xác định được đã xác định được 6 giống nấm gồm: *Aspergillus* spp; *Rhizopus* spp; *Penicillium* spp; *Fusarium* spp; *Phoma* sp. Kết quả này cho thấy sự đa dạng về các giống nấm gây ô nhiễm thuốc cổ truyền, tuy nhiên giống *Aspergillus* chiếm ưu thế cao nhất chiếm 28/63(44,44%). Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của các tác giả: Lê Quang Hạnh Thư và CS (2021), Tạ Thu Lan (2024) [121], [122].

- Lê Quang Hạnh Thư và CS (2021), nghiên cứu ở 58 mẫu thuốc cổ

truyền tại Quận 5 Thành phố Hồ Chí Minh, bằng phương pháp hình thái học đã xác định các giống nấm ký sinh ở thuốc cổ truyền gồm: *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Mucor* spp, *Rhizopus* spp. Tỷ lệ mẫu ô nhiễm nấm mốc là 35/58(60,34%), trong đó có 21 mẫu nhiễm nấm vượt quá giới hạn cho phép ($> 500\text{CFU/g}$) là 21 mẫu chiếm 21/35(60,0%), số mẫu có nhiễm nấm men là 35/58 (60%) [122].

- Tạ Thu Lan (2024), nghiên cứu nhiễm nấm tại một số hiệu thuốc cổ truyền ở Hà Nội. Bằng phương pháp hình thái học đã xác định được 93 chủng nấm thuộc 5 loài là *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamarii* và *Aspergillus aculeatus*, trong đó hai loài *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* xuất hiện các chỉ số có nhiều RD và chỉ số có mặt FQ lần lượt là 25,8%; 60,0% và 11,8%, 50% tiếp đến là *Aspergillus niger* với chỉ số RD = 37,6%, FQ = 69,0% [121]

4.1.2.1. Kết quả định danh đến giống

Từ 56 mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm, đã xác định 63 chủng nấm, trong đó có 02 mẫu là chưa xác định được loài mới xác định được giống là mẫu VT98 là giống *Aspergillus* spp. và VT162 là giống *Phoma* spp (bảng 3.6), khi so sánh với ngân hàng Gen banks chuẩn quốc tế, tỷ lệ tương đồng từ 99,9% đến 100% là 63/63 mẫu. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng các loài nấm gây ô nhiễm thuốc cổ truyền, trong đó nổi bật vai trò của *Aspergillus* và cũng tương đồng với nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn (2018), cũng trên đối tượng là thuốc cổ truyền có 7 loài nấm sợi và 4 loài nấm men thuộc 6 giống, trong đó giống *Aspergillus* chiếm tỷ lệ cao nhất 82,0%, tiếp đến là *Rhizopus oryzae* chiếm 6,0% [48].

Nghiên cứu tại Thành phố Hồ Chí Minh ở 58 mẫu dược liệu của Lê Quang Hạnh Thu (2021), cho thấy có 4 giống nấm gồm: *Aspergillus*, *Pennicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* [122].

Tại Hà Nội, Tạ Thu Lan (2024), Bằng phương pháp hình thái học xác định nhiễm nấm ở dược liệu, tác giả đã xác định được 93 chủng nấm thuộc 1 giống *Aspergillus* có 5 loài là *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamarii* và *Aspergillus aculeatus* [121]

Nguyễn Thu Mai và CS (2009), đã xác định được 4 loài trong 1 giống *Aspergillus*, gồm: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficunum* phân lập nấm từ hạt đậu phộng ở các chợ Thành phố Cần Thơ bằng kỹ thuật hình thái học [48] .

4.1.2.2. Kết quả định loại đến loài

Từ các mẫu nấm đã xác định đến giống, bằng kỹ thuật giải trình tự gen và so sánh với các gen ITS1, ITS2 chuẩn trong ngân hàng gen banks quốc tế, kết quả thống kê theo bảng 3.9 cho thấy có 16 loài nấm thuộc 5 giống nấm, trong đó giống *Aspergillus* có 9 loài; Giống *Rhizopus* có 2 loài; Giống *Penicillium* có 3 loài ; Giống *Fusarium* có 1 loài; Giống *Phoma* spp có 1 loài chưa xác định được tên loài.

Kết quả nghiên cứu này cho thấy sự đa dạng phong phú về thành phần loài nấm ký sinh trên các vị thuốc cổ truyền, nhưng vai trò nổi bật vẫn là các giống nấm *Aspergillus* tiếp đến là *Penicillium* và *Fusarium*, giống *Rhizopus* và *Phoma* spp chiếm tỷ lệ rất nhỏ. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với các tác giả trên thế giới và Việt Nam, cụ thể:

Trên thế giới:

Nhiều nhà khoa học đã có những công trình khoa học có giá trị, với những kỹ thuật nghiên cứu tiên tiến nghiên cứu về tình trạng nhiễm nấm trong lương thực và thực phẩm cũng như vai trò của các độc tố của vi nấm với sức khỏe con người và cách phòng tránh. Các nghiên cứu của C. El AARaj và CS (2015), sử dụng kỹ thuật PCR với gen mồi ITS4, ITS5 của ADN ribosomal xác định tỷ lệ thành phần loài nấm *Aspergillus* spp và *Penicillium* spp trong 88 mẫu

lúa mì, gạo và hạt cà phê, kết quả điện di PCR là những băng sán rõ nét, ranh giới rõ, chứng tỏ môi và quy trình chạy PCR là phù hợp và tối ưu. Khi phân tích các chuỗi gen chuẩn thì *Aspergillus* spp chiếm $\approx 80\%$, *Penicillium* spp chiếm 16%, các loài nấm khác 4%. Fabiana Aparecida Couto (2014), về sự đa dạng quần thể nấm dạng sợi trong các hạt cà phê trồng theo cách truyền thống và hữu cơ, kết quả: Từ 18 mẫu cà phê đã phân lập được 346 chủng nấm, với 32 loài, 12 chi gồm: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*. Tại Thổ Nhĩ Kỳ (1960), các nhà khoa học đã phát hiện 100 000 con gà tây con đã chết do căn bệnh “X”, do ăn lạc Brazil nhiễm *Aspergillus flavus* [38]. Saba Shabeer và CS (2022), nghiên cứu tại Viện nghiên cứu bệnh cây trồng nông nghiệp Pakistan thấy vai trò nổi bật của hai loài nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* trong sinh độc tố aflatoxin và là nguyên nhân chủ yếu gây nhiễm độc thực phẩm [114]

- **Tại Việt Nam**

+ Nguyễn Đình Nga (2012), nghiên cứu nhiễm nấm trong một số thuốc cổ truyền bán ở Quận 5 – Thành phố Hồ Chí Minh bằng định danh dựa vào khóa định loài nấm, kết quả: 86/141(60,99%) nhiễm nấm, các loài nấm thường gặp là *A. niger*, *A. flavus*, *A. glaucus*, *Penicillium* và nấm men [14].

+ Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu 505 mẫu thuốc cổ truyền tại các bệnh viện tỉnh Nghệ An bằng nuôi cấy nấm trong môi trường Saboraud đã xác định được 7 loài nấm sợi, 4 loài nấm men, cụ thể: *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 50/50 mẫu (100,00%), *A. tubingensis* chiếm 9/50(18,00%), *A. flavus* chiếm 1/50(2,00%), *A. arzyae* chiếm 1/50(2,00%), *Rhizopus arzyae* chiếm 3/50 (6,00%), *Candida parasilosis* chiếm 1/50(2,00%), *K. ohmeri* chiếm 1/50(2,00%), *Corynespora smithii* chiếm 1/50(2,00%), loài nấm khác 1/50(2,00%) [47].

+ Nguyễn Thu Mai và CS (2009), phân lập nấm từ hạt đậu phộng ở các chợ Thành phố Cần Thơ, sau khi định danh sơ bộ bằng kỹ thuật hình thái đã xác định được 4 loài *Aspergillus* gồm *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*,

Aspergillus niger, *Aspergillus ficinum* [48].

+ Tại Tây Nguyên cũng có một số tác giả nghiên cứu mức độ nhiễm nấm và aflatoxin trong ngô, lạc tại một số gia đình huyện Ea H'leo, Cư M' Gar, Kroong Pắc tỉnh Đắk Lắk, đã xác định chủng *Aspergillus flavus* trong 14,1% mẫu ngô, 11,8% mẫu lạc [49].

+ Nguyễn Thị Xuân Sâm và CS (2022), nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR, từ 32 chủng nấm được phân lập đã xác định được 4 chủng nấm cho kết quả (+) với 4 gen *aflr*, *avfa*, *omtA* và *ver-1* có vai trò sinh aflatoxin [46].

+ Nghiên cứu trên 10 mẫu thuốc liên nhục tại Hà Nội của Trần Trịnh Công và CS (2025), cho thấy: Các mẫu thuốc nhiễm các loài *Aspergillus* spp gồm: *Aspergiullus niger*, *Aspergiullus flavus*, *Aspergiullus fumigatus*, *Aspergiullus tamarii*, *Aspergiullus ustus*, *Aspergiullus aculeatus*, trong đó tỷ lệ nhiễm *Aspergiullus flavus* cao nhất 3/10 mẫu [123].

4.2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An

4.2.1. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền

- Tỷ lệ thu hồi aflatoxin trong các mẫu thuốc cổ truyền

Kết quả nghiên cứu tại các bảng 3.15, bảng 3.16, bảng 3.17, cho thấy hầu hết các mẫu xét nghiệm bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng máy HPLC có độ thu hồi tốt với các loại aflatoxin B₁, B₂, G₁ từ 90% đến 100,0%. Riêng với G₂ ở một số mẫu có độ thu hồi thấp là: Đăng tâm, mộc thông, đinh hương. Cụ thể, tỷ lệ thu hồi trên 50% chung của 4 loại aflatoxin chiếm 88,64%(195/220), thu hồi được dưới 50% chiếm 11,36%(25/220). Kết quả này khẳng định quy trình kỹ thuật lựa chọn trong nghiên cứu là phù hợp và tối ưu nhất, đảm bảo đầy đủ yêu cầu phân tích định lượng aflatoxin.

- Nguyễn Ngọc Kim Vy (2019), tại Đại học California Hoa Kỳ đã tổng

hợp từ 17 nghiên cứu khác nhau ở Trung Quốc, Đài Loan và Châu Phi, kết quả cho thấy aflatoxin là nguyên nhân gây ra 17% các ca ung thư gan, aflatoxin có nhiều trong các loại ngũ cốc bị mốc như ngô, lạc, sắn, vai trò quan trọng của 2 loài *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus*. Các nhà khoa học đã xác định được 16 loại aflatoxin khác nhau B1, B2a, B2, B3, G1, G2a, M1, GM2, P1, RO, RB1, RB2, AFL, AFLH, AFLM và những chất bắt nguồn từ methoxy, ethoxy và acetoxy, trong đó aflatoxin B1 là chất xuất hiện trong tự nhiên, các chất còn lại là sản phẩm sinh ra trong quá trình chuyển hóa trao đổi chất [124].

- Trần Trịnh Công và CS (2025), cho thấy: Các mẫu thuốc nhiễm các loài *Aspergillus* spp và 3/10 mẫu đều nhiễm aflatoxin B1 với hàm lượng dao động từ 2,8 -13,6 ppb, vượt quá ngưỡng cho phép là 5,6 - 27,2 lần [123].

Kết quả trên cho thấy sự đa dạng, phong phú của các loại aflatoxin, mỗi loài nấm sản sinh 1 hoặc nhiều loại aflatoxin, tùy theo điều kiện môi trường nấm ký sinh.

- Aflatoxin được phát hiện đầu năm 1960 tại trang trại chăn nuôi gà tây tại Thổ Nhĩ Kỳ, với 100 000 con gà tây đã chết có liên quan đến nhiễm độc tố trong nấm *Aspergillus flavus* – aflatoxin. Đến nay đã có hơn 20 loại aflatoxin được phát hiện có vai trò y học [38].

- Năm 2024, Elias Oyesigye nghiên cứu sự có mặt các độ tố nấm và nguy cơ phơi nhiễm aflatoxin B1 trong sắn lát của dân tại Uganda. Tổng cộng 192 mẫu sản phẩm sắn (96 mẫu bột và 96 mẫu sắn lát, mỗi mẫu có 48 mẫu từ nông dân và 48 mẫu từ người bán buôn) đã được phân tích bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao. Tất cả các mẫu dương tính, bất kể nguồn gốc (bột mì hay khoai tây chiên), đều cho thấy nồng độ AFB1 vượt ngưỡng quy định của EU là 5 µg/kg. Tổng hàm lượng fumonisin (FB1 + FB2), zearalenone (ZEN) và deoxynivaleno(DON) cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) trong bột sắn (14,3 µg/kg;

3,71 µg/kg; 25,1 µg/kg) so với khoai tây chiên (6,54 µg/kg; 1,25 µg/kg; 0,25 µg/kg). Không phát hiện thấy Aflatoxin G2 trong bất kỳ mẫu nào trong số 192 mẫu. Các mẫu bột sắn từ nông dân cho thấy nồng độ trung bình của AFB1 (27,1 µg/kg), tổng aflatoxin (78,2 µg/kg) và ochratoxin A (79,6 µg/kg) cao hơn đáng kể ($P < 0,05$), trái ngược với các nhà bán buôn, nơi có nồng độ trung bình thấp hơn đáng kể lần lượt là 8,91, 5,79 µg/kg và 2,44 µg/kg, chỉ ra nguồn ô nhiễm mycotoxin quan trọng. Người tiêu dùng sắn ở miền Bắc Uganda có nguy cơ cao hơn, với ước tính 2,06 ca ung thư trên 100.000 người mỗi năm so với 0,25 ở miền Đông Uganda [125].

- Samrand Reshadi và CS (2024), Xác định nồng độ aflatoxin B1, B2, G1 và G2 trong bánh phồng phô mai làm từ bột ngô tại Iran bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng máy HPLC, nghiên cứu thực hiện trên 27 mẫu bánh phồng phô mai của ba thương hiệu nổi tiếng. Kết quả nồng độ aflatoxin cao nhất trong các nhãn hiệu A, B và C lần lượt được quan sát thấy ở các mẫu A1 (1,35 ng/mL), B2 (0,95 ng/mL) và C2 (1,22 ng/mL). Ngoài ra, các mẫu A3 (0,93 ng/mL), B3 (0,80 ng/mL) và C1 (0,75 ng/mL) có nồng độ aflatoxin thấp nhất trong số các nhãn hiệu này. Kết quả nồng độ aflatoxin thấp hơn giới hạn cho phép ở Iran (5 µg/kg) trong tất cả các mẫu được nghiên cứu [126].

Trong nghiên cứu này tổng số 170 mẫu thuốc cổ truyền trong đó có 56 mẫu nhiễm nấm và 114 mẫu thuốc không nhiễm nấm đều được xét nghiệm định lượng aflatoxin tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Quốc gia bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng máy HPLC, kết quả có 19 mẫu nhiễm nấm xác định sự có mặt của aflatoxin, 6 mẫu không nhiễm nấm nhưng vẫn có mặt aflatoxin. Sự xuất hiện 6 mẫu không nhiễm nấm mà vẫn (+) với aflatoxin có thể giải thích như sau: Các vị thuốc cổ truyền đã từng nhiễm nấm, nên nhiễm aflatoxin, nhưng các vị thuốc cổ truyền đã được xử lý bằng các kỹ thuật khác nhau làm sạch nấm trên bề mặt các vị thuốc, tuy nhiên do các vị

thuốc thuốc cỏ truyền bị nhiễm nấm lâu ngày thì các aflatoxin đã thâm sâu vào bên trong các vị thuốc nên có làm hết nấm trên bề mặt thuốc thì vẫn có aflatoxin.

Kết quả tại hình 3.8, xác định được sắc ký đồ là các đường cong biểu diễn các giá trị aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 là liên tục với các giá trị đỉnh biểu diễn hàm lượng tối đa của các aflatoxin tương ứng, chứng tỏ mẫu nhiễm cả 4 loại aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2, trong đó hàm lượng aflatoxin B2 có giá trị cao nhất. Hình 3.9, đường biểu diễn hàm lượng aflatoxin là đường cong các giá trị aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 là liên tục với các giá trị dao động quanh giá trị 0, chứng tỏ mẫu không nhiễm aflatoxin. Mặt khác, kết quả tại bảng 3.30, cho thấy tỷ lệ mẫu thuốc cỏ truyền nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT ($> 0,5$ bpp) là 52,0%(13/25) và không vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT ($< 0,5$ bpp) là 48,0%(12/25), không có sự khác biệt giữa tỷ lệ mẫu vượt và không vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT với $p > 0,05$. Kết quả chạy sắc ký đồ của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với hình ảnh sắc ký đồ của Nguyễn Thành Duy (2025), bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao chạy bằng đầu dò huỳnh quang ở các mẫu đậu phộng, nho khô, ớt bột, hạt bắp. Đồ thị chạy sắc ký khí là những đường liên tục có đỉnh ở các nồng độ tối đa B1, B2, G1, G2 theo thời gian chạy lưu mẫu [109].

Kết quả tại Hình 3.10, hình 3.11 cho thấy đồ thị đường cong ROC có độ nhạy $> 75\%$ ở cả 4 loại aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2; Độ đặc hiệu đều $> 85\%$ ở cả 4 loại aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2. Đường biểu diễn đường cong ROC nằm ở phía trên đường phân giác góc $\frac{1}{4}$ thứ nhất, phía trên đường đồ thị hàm số $y = ax + b$ với a dương. Kết quả này xác định kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao bằng máy HPLC có

độ thu hồi tốt, cho kết quả đáng tin cậy.

Kết quả nghiên cứu này cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả của nhiều nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới khi sử dụng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao để xác định sự có mặt của các loại aflatoxin trong các sản phẩm thuốc cổ truyền, các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch và chế biến thành phẩm sử dụng cho con người.

- Các nghiên cứu nhiễm aflatoxin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Tại châu Á, Việt Nam, Trung Quốc và các nước khác có nền y học cổ truyền phát triển từ hơn 5000 năm trước, việc sử dụng thảo dược là cây, con làm thuốc được sử dụng rộng rãi, trong quá trình chế biến một tỷ lệ không nhỏ nhiễm nấm và các sản phẩm chuyển hóa của nấm nhất là aflatoxin, có hơn 20 loại aflatoxin được phát hiện, trong đó 4 loại aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 có vai trò y học lớn nhất. Vì vậy, cần đưa quy trình xác định, phân tích hàm lượng aflatoxin nhằm kiểm soát chất lượng thảo dược là cần thiết.

Năm 2021, các nhà khoa học Trung Quốc đã phân tích từ các báo cáo trong nước về tỷ lệ nhiễm nấm và phân bố rộng rãi nhất cũng như vai trò sinh độc tố aflatoxin của *Aspergillus flavus*. Kết quả cho thấy > 50% mẫu thực phẩm có hàm lượng aflatoxin vượt ngưỡng nhiều lần cho phép [62], [63].

Theo nghiên cứu của Fei Tian và Mina Nan (2022), đã xác định được sự có mặt của các chất trung gian aflatoxin, alternariol, alternariol monomethyl ether, ochartoxin A, rhizocin, T-2 và zearalenone, fumonisins, độc tố T-2 và zearalenone...có trong nguyên liệu thô và các sản phẩm trung gian, sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men sữa đậu nành bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, các tác giả thấy và vai trò quan trọng của nhiều loài nấm sợi như *Aspergillus*, *Monascus*, *Muscor*, *Penicillium*, *Rhizopus* và *Zymomonas* [127].

Saba Shabeer và CS (2022), thấy hai loài nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* trong sinh độc tố aflatoxin và là nguyên nhân chủ yếu

gây nhiễm độc thực phẩm. Trong nhiều loại aflatoxin có aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin 2 là 4 aflatoxin phổ biến nhất có tác hại lớn nhất cho sức khỏe con người. Từ đây tác giả cũng khuyến cáo cần áp dụng các kỹ thuật cao giám sát sự có mặt và nồng độ các độc tố aflatoxin, trong đó kỹ thuật sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, áp dụng kỹ thuật sinh học phân tử PCR và giải trình tự gen giám sát sự có mặt của các loài nấm *Aspergillus* spp, *Monascus* spp, *Muscor* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp và *Zymomonas* spp. Hiện nay trên thế giới nhiều nước áp dụng tiêu chuẩn ngưỡng tồn tại của aflatoxin từ 2 - 20 ppb [114].

Keng –Wen Lien và CS (20190, nghiên cứu 1089 mẫu kẹo lạc, bơ lạc, lạc nhập khẩu vào Đài Loan bằng kỹ thuật sắc ký khí lỏng/khối phổ song song, kết quả các mẫu (+) với nấm đều có hàm lượng trung bình 2,40µg/kg aflatoxin B1, 0,41µg/kg aflatoxin B2, 0,19 µ/kg aflatoxin G1 và 0,03µg/kg aflatoxin G2 [85].

Nghiên cứu ở 5 quốc gia Châu Phi với 4 vùng sinh thái khác nhau thấy 76% mẫu ngô, 64% mẫu kê, 60% mẫu lúa dương tính với aflatoxin B1, trong đó 26% mẫu ngô, 10% mẫu kê, 11% mẫu lúa có hàm lượng aflatoxin B1 vượt ngưỡng cho phép [88].

Tại Trung Quốc bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao Dizhe Wei (2017), đã xác định được 17 độc tố của nấm trong 220 hoa quả như *Alternaria*, ochratoxin A, patulin, trichothecenes, tỷ lệ mẫu nhiễm ít nhất 1 loại độc tố là 64,6%(142 mẫu), tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất là mơ sấy khô 48,2%, cao nhất là kỳ tử 83,3%, *alternaria* là chất độc cơ bản trong các hoa quả sấy khô, ngoài ra có 31,4% số hoa quả sấy khô có nhiễm từ 2 đến 4 loại độc tố. Từ kết quả này các nhà khoa học đi đến khuyến cáo cần có tiêu chuẩn an toàn và giới hạn cho phép nồng độ *alternaria* trong hoa quả sấy khô [128].

Kết quả nghiên cứu này có số mẫu vượt tiêu chuẩn cho phép (> 0,5 bpp) QCVN 8-1:2011/BYT là 48,0% cao hơn kết quả nghiên cứu của của Phan Văn

Mạnh và CS (2024), là 31,7%(34/80) cũng bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao. Kết quả nghiên cứu của Phan Văn Mạnh cho thấy nồng độ aflatoxin B1 trung bình trong 180 mẫu lạc, gạo, ngô, vùng tại Hà Nội năm 2022 là $2,86 \pm 5,08 \mu\text{g/kg}$, mức cao nhất là $29,1 \mu\text{g/kg}$, lạc và vùng là 2 loại thực phẩm có mức ô nhiễm cao nhất $4,43 \mu\text{g/kg}$, gạo có mức ô nhiễm thấp nhất $1,25 \mu\text{g/kg}$. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin B1 chung là 45,6%(82/180), trong đó tỷ lệ mẫu ô nhiễm aflatoxin vượt tiêu chuẩn QCVN 8-1:2011/BYT là 31,7%(34/80) [129].

- Các nghiên cứu nhiễm aflatoxin bằng các kỹ thuật ELISA và các kỹ thuật khác

Trên thế giới và Việt Nam đa số các nước sử dụng kỹ thuật ELISA để phát hiện nhiễm aflatoxin, lý do kỹ thuật này rẻ tiền, cho kết quả nhanh, dễ thực hiện, phù hợp với các nước nghèo, cho kết quả nhanh chóng, tại chỗ, điển hình là các nghiên cứu của:

Anima J Sirma và CS (2015), nghiên cứu về tình trạng nhiễm aflatoxin do nấm trong ngũ cốc và kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống của nấm của người dân tại Kenya trong 408 mẫu thực phẩm bằng kỹ thuật ELISA và phỏng vấn hộ gia đình, kết quả 77,9% mẫu ngô nhiễm aflatoxin, 92,9% các mẫu kê nhiễm aflatoxin. Gần như 100% người dân không có kiến thức hiểu biết về nấm ở thực phẩm và phương pháp phòng chống nấm [72].

Kỹ thuật sắc ký miễn dịch bằng các que gắn kháng thể vàng nano để phát hiện nhanh độc tố aflatoxin và fumonisin B1 trong ngũ cốc đã được Xi – Chun - Wang và CS (2016), sử dụng phát hiện kháng nguyên – kháng thể đơn dòng kháng fumonisin B1 kết hợp sắc ký khí, phát hiện nhanh ngũ cốc nhiễm fumonisin B1 mà các dải mắt thường không phát hiện được. Đây là xét nghiệm ưu việt và hữu ích [81]. Các nhà khoa học là sử dụng kit phát hiện nhanh độc tố, thông qua xác định có mặt độc tố của nấm cũng gián tiếp khẳng định mẫu lương thực hoặc mẫu thuốc cổ truyền có nhiễm nấm.

Elif Burcu Bahadir (2016), đã thiết kế, sản xuất các que thử nhanh dựa trên nguyên lý kháng nguyên - kháng thể phát hiện aflatoxin và que thử “lai” phát hiện DNA của nấm [101].

Trước đây các kit chẩn đoán nhanh bằng cơ chế miễn dịch xác định sự có mặt của vi nấm thông qua độc tố của nấm, tuy nhiên, chỉ phát hiện có tính chất định tính. Để khắc phục nhược điểm này các nhà khoa học đi sâu vào nghiên cứu sản xuất ra các loại kit chẩn đoán nhanh có thể chẩn đoán định tính và định lượng là hướng nghiên cứu mới cần được đi sâu phát triển.

Ngày nay, nhiều nghiên cứu *ứng dụng kỹ thuật trí tuệ nhân tạo và hình ảnh siêu phổ để chẩn đoán ô nhiễm aflatoxin*, nghiên cứu của Lizzie Williams và CS năm 2025, đo lường mức độ nhiễm độc tố Aflatoxin trong hạt dẻ cười bằng cách áp dụng trí tuệ nhân tạo vào hình ảnh siêu phổ ở 300 mẫu hạt dẻ cười, hình ảnh siêu phổ, bao gồm ba mức aflatoxin (<8 ppn, >160 ppn và >300 ppn), các bước sóng chính đã được xác định để chỉ ra sự hiện diện của ô nhiễm. Giảm chiều với K-Means đạt độ chính xác 84,38%, trong khi mô hình ResNet sử dụng bước sóng 866,21 nm đạt 96,67%. Kết quả này mở ra một hướng mới có tính khả thi cao trong đánh giá ô nhiễm aflatoxin [130].

4.2.2. Tỷ lệ, thành phần loại aflatoxin

Kết quả nghiên cứu tại các hình 3.12, bảng 3.15, bảng 3.16 cho thấy: Tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin chung là 14,71%, trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm B2 cao nhất 7,06%(12/170), tiếp đến là tỷ lệ mẫu nhiễm G1 chiếm 3,53%(6/170), thấp nhất là mẫu nhiễm G2 1,76% (3/170). Trong số 16 mẫu nhiễm aflatoxin, thì có mẫu nhiễm 1, 2 hoặc 3 loại aflatoxin, tổng số đã xác định được 25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin, trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin B2 là 52%(13/25), nhiễm aflatoxin B1 là 12%(3/25), nhiễm aflatoxin G1 là 24% (6/25) và nhiễm aflatoxin G2 là 12%(3/25). Khác biệt có ý nghĩa thống giữa tỷ lệ mẫu nhiễm aflatoxin B2 so với aflatoxin B1, aflatoxin G1, aflatoxin G2 với các 52%(13/25) so với 12%(3/25), 24% (6/25) và 12%(3/25) với $p < 0,05$. Kết quả này cho thấy

vai trò quan trọng của aflatoxin B2 trong gây ô nhiễm độc chất với thuốc cổ truyền. Tại bảng 3.18, cho thấy tỷ lệ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các vị thuốc cổ truyền nhiễm nấm và không nhiễm nấm với các tỷ lệ 19,64%(11/56) so với 4,39%(5/114), với $p < 0,05$. Kết quả này càng củng cố vai trò sinh độc tố aflatoxin của nấm.

Đến nay, đa số các nhà khoa học cho rằng ô nhiễm aflatoxin B1 là phổ biến nhất, nhất là các loại ngũ cốc, ngô, gạo, lạc, vừng. Các aflatoxin khác B2, G1, G2 có ở các sản phẩm chế biến sau thu hoạch như kẹo, nước hoa quả, sản phẩm sấy khô, các vị thuốc đông dược. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy aflatoxin B2 chiếm tỷ lệ cao nhất 52%, khác biệt với một số nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ nhiễm aflatoxin B1 chiếm tỷ lệ cao nhất, như:

- Keng –Wen Lien và CS (20190, nghiên cứu 1089 mẫu kẹo lạc, bơ lạc, lạc nhập khẩu vào Đài Loan thì aflatoxin B1 có tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là aflatoxin B2, aflatoxin G1 và aflatoxin G2 [85].

- Saba Shabeer và CS (2022), thấy hai loài nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* trong sinh độc tố aflatoxin và là nguyên nhân chủ yếu gây nhiễm độc thực phẩm. Trong đó aflatoxin B1 phổ biến nhất, tiếp đến là aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 [114].

Theo FAO, các quốc gia Châu Phi có khoảng 25% ngũ cốc cung cấp cho con người có chứa một lượng mycotoxin, trong đó có aflatoxin B1 là độc tố phổ biến và nguy hiểm nhất, chiếm tới 75% lượng các độc tố sinh ra do nấm. Các loại lương thực nhiễm aflatoxin gồm: 76% mẫu ngô, 64% mẫu kê, 60% mẫu lúa dương tính với aflatoxin B1, trong đó 26% mẫu ngô, 10% mẫu kê, 11% mẫu lúa có hàm lượng aflatoxin B1 vượt ngưỡng cho phép [26].

Xi - Chun Wang và CS (2016), đã sử dụng kỹ thuật sắc ký miễn dịch định lượng độc tố của nấm, thông qua định lượng phức hợp kháng nguyên –

kháng thể đơn dòng kháng fumonisin B₁, phát hiện nhanh ngũ cốc nhiễm fumonisin B₁ [81].

Sở dĩ có sự khác biệt giữa kết quả của các nghiên cứu này với các nghiên cứu trên vì lý do sau: Đa số các tác giả trên thế giới đều thực hiện trên đối tượng nghiên cứu là các loại hạt, ngũ cốc rất giàu dinh dưỡng, rất phù hợp cho một số loài nấm như *Fusarium* spp, *Penicillium* spp, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*...trong khi nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên các loại cây, con, củ, quả, chỉ một số ít là hạt giàu dinh dưỡng thuộc cổ truyền đã qua xử lý sao, tẩm, phơi khô, có thể cả các chất bảo quản như lưu huỳnh, xông khói...phải mất thời gian rất dài mới bị ô nhiễm các loài nấm mà trong đó thành phần loài nấm rất đa dạng, nên các aflatoxin sinh ra cũng đa dạng hơn trong ngũ cốc.

4.2.3. Một số yếu tố nguy cơ nhiễm aflatoxin

Kết quả tại các bảng 3.20, bảng 3.21 và 3.23 cho thấy: Có liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin chung ở các vị thuốc cổ truyền với OR = 5,165, 95%CI:1,69 -15,70, $p < 0,01$, Mẫu thuốc cổ truyền nhiễm nấm có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 5,165 lần mẫu thuốc cổ truyền không nhiễm nấm. Có liên quan giữa nhiễm nấm với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền là thuốc bắc OR = 7,373, 95%CI:1,621 - 33,542, $p < 0,01$, thuốc cổ truyền là thuốc bắc nhiễm có nguy cơ nhiễm aflatoxin cao gấp 7,373 lần mẫu thuốc cổ truyền là thuốc nam.

Các kết quả trên hoàn toàn phù hợp với thực tế về ô nhiễm nấm ở các sản phẩm sau thu hoạch và thuốc cổ truyền với các cơ sở khoa học sau:

- Nuôi trồng, thu hoạch:

Thuốc cổ truyền được chế biến từ các sản phẩm nông nghiệp là cây thuốc, củ, quả, hạt và cả xác động vật xây khô như giun đất, cá ngựa...thì quá trình nhiễm nấm có thể xảy ra ở rất nhiều khâu từ canh tác, nuôi trồng, thu hoạch, chế biến, vận chuyển, lưu thông - phân phối...trong quá trình đó nếu điều kiện bảo quản không tốt như: Nhiệt độ cao $> 25^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $> 70\%$, tốc độ

gió < 0,5 m/s và > 1,5 m/s, dinh dưỡng phù hợp, các vị thuốc không được kín ngăn cách với môi trường, các bào tử nấm luôn luôn tồn tại trong không khí có thể xâm nhập và ký sinh ở các vị thuốc cổ truyền và sinh ra các độc tố là aflatoxin, ergot alkaloids. Việc nhiễm nấm xảy ra liên tục ở tất cả các khâu của quá trình sản xuất, từ khâu canh tác trên đất ô nhiễm nấm, thiếu thuốc bảo vệ cây trồng, thu hoạch, bảo quản không tốt. Điều này thể hiện rõ trong nghiên cứu của các tác giả:

Nghiên cứu tại Brazil của Fabiana Aparecida Couto (2014), về sự đa dạng quần thể nấm mốc dạng sợi trong các hạt cà phê trồng theo cách truyền thống và hữu cơ, đã phân lập được 346 chủng nấm mốc, với 32 loài, 12 chi. Tại Thổ Nhĩ Kỳ (1960), các nhà khoa học đã phát hiện 100 000 con gà tây con đã chết do căn bệnh “X”, do ăn lạc Brazil nhiễm *Aspergillus flavus* [38].

Saba Shabeer và CS (2022), nghiên cứu tại Pakistan thấy vai trò nổi bật của hai loài nấm *Aspergillus flavus* và *Aspergillus parasiticus* trong sinh độc tố aflatoxin và là nguyên nhân gây nhiễm độc thực phẩm [114].

Nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Kim Vy (2022) đã xác định được có 16 loại aflatoxin khác nhau B1, B2a, B2, B3, G1, G2a, M1, GM2, P1, RO, RB1, RB2, AFL, AFLH, AFLM và những chất bắt nguồn từ methoxy, ethoxy và acetoxo, trong đó chỉ aflatoxin B1 là chất xuất hiện trong tự nhiên, các chất còn lại là sản phẩm sinh ra trong quá trình chuyển hóa trao đổi chất của nấm với môi trường ký sinh và xảy ra ở tất cả các khâu của quá trình sản xuất, canh tác [124].

- Điều kiện môi trường bảo quản thuốc cổ truyền:

Như chúng ta đã biết các yếu tố về thời gian, nhiệt độ, độ ẩm, dinh dưỡng của các ký chủ ảnh hưởng trực tiếp đến sự phát triển của nấm, kết hợp với các thiết bị và điều kiện bảo quản thuốc cổ truyền không tốt sẽ làm cho quá trình nhiễm nấm nhanh và mạnh hơn. Các nghiên cứu trong và ngoài nước đã chứng

minh cơ sở khoa học trên.

Đào Thiện và CS (2012), nghiên cứu mô hình hóa và dự đoán quá trình phát triển của nấm nhằm mục đích đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển của các loại nấm trên thực phẩm, chế phẩm nông nghiệp...tác giả đã áp dụng mô hình Gompertz: $P = A \exp(-\exp[\mu_{me}/A(\lambda - t) + 1])$ (1); Mô hình Logistic: $P = P_{max}/[1 + \exp(k(\lambda + t))]$ (2). Ứng dụng các mô hình trên, có thể ước lượng được thời gian cần thiết để đạt được tỷ lệ 50% bào tử nấm nảy mầm gây ô nhiễm thực phẩm và chế phẩm nông nghiệp sau thu hoạch. Đây cũng là cơ sở để xây dựng hạn sử dụng trong các điều kiện môi trường khác nhau [53].

Lê Quang Hạnh Thu (2021), nghiên cứu ở 58 mẫu thuốc đông dược tại Quận 5 Thành phố Hồ Chí Minh, bằng phương pháp hình thái học đã xác định 4 giống nấm ký sinh ở thuốc đông dược *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Mucor* spp, *Rhizopus* spp. Có 19 mẫu thuốc cổ truyền tại các cơ sở y học cổ truyền có độ ẩm vượt tiêu chuẩn cho phép theo tiêu chuẩn về dược liệu của dược điển Việt Nam, 21 mẫu thuốc vượt tiêu chuẩn nhiễm nấm cho phép ($> 500\text{CFU/g}$), có liên quan giữa độ ẩm với ô nhiễm nấm [122].

Liên quan giữa nhiễm nấm trong một số dược liệu bán ở Quận 5 – Thành phố Hồ Chí Minh chủ yếu do điều kiện bảo quản không tốt. Đậu Huy Hoàn (2018), nghiên cứu tại Nghệ An thấy 100% nhà kho thuốc cổ truyền không có máy điều hòa nhiệt độ, không có máy hút ẩm, không có quạt thông gió, không có túi hóa chất chống ẩm mốc [47].

Tại Tây Nguyên Nguyễn Vũ Thuận (2022), thấy nhiễm nấm và aflatoxin trong ngô, lạc tại một số gia đình huyện Ea H'leo, Cư M' Gar, Kroong Pắc tỉnh Đắk Lắk có liên quan đến điều kiện bảo quản không tốt đã dẫn đến tỷ lệ nhiễm *Aspergillus flavus* 14,1% trong ngô, 11,8% mẫu lạc [49].

Kết quả của chúng tôi có chung với kết luận của các nhà khoa học:

- Tổ chức Nông Lương Thế giới (FAO), khoảng 50,0% sản phẩm nông

nghiệp sau thu hoạch nhiễm nấm, trong đó 25% ngũ cốc cung cấp cho con người có chứa một lượng mycotoxin và aflatoxin, nguyên nhân do hạn chế trong khâu thu hoạch, chế biến, bảo quản [26].

- Hayrettin ÖZER và CS (2025), nghiên cứu nguy cơ nhiễm Aflatoxin B1 và Aflatoxin tổng số (B1, B2, G1 và G2) trong quả hồ trăn và quả sung khô bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Kết quả Aflatoxin đã được phát hiện trong 16 mẫu quả hồ trăn khô và 5 mẫu quả sung khô. Trong khi G1 và G2 được phát hiện trong 3 mẫu quả hồ trăn, AFB1 được phát hiện trong khoảng 0,21- 404,62 ppb trong 4 mẫu và AFB2 được phát hiện trong khoảng 0,1-0,96 ppb trong 3 mẫu. Tổng hàm lượng aflatoxin dao động từ tối thiểu 5,04 ppb đến tối đa 405,58 ppb với giá trị trung bình là 108,53 ppb. Ngoài ra, khi phân tích hàm lượng aflatoxin của các mẫu quả sung khô, sự hiện diện của AFB1, AFB2, AFG1 và AFG2 đã được phát hiện trong một số mẫu. Aflatoxin AFG1 (0,03 ppb) và AFG2 (0,05 - 0,06 ppb) đã được phát hiện trong 1 mẫu quả sung và AFB1 và AFB2 đã được phát hiện trong 3 mẫu quả sung. AFB1 được phát hiện trong khoảng 25,16 - 44,45 ppb trong 3 mẫu và AFB2 được phát hiện trong khoảng 0,01 - 6,07 ppb trong 3 mẫu. Tổng hàm lượng aflatoxin dao động từ tối thiểu 0,56 ppb đến tối đa 51,15 ppb với giá trị trung bình là 25,105 ppb [131].

- Anima J Sirma và CS (2015), nghiên cứu về tình trạng nhiễm aflatoxin do nấm trong ngũ cốc và kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống của nấm của người dân tại Kenya, cho thấy 100% người dân không có kiến thức hiểu biết về nấm ở thực phẩm và phương pháp phòng chống nấm [72].

- Kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống nấm chưa tốt:

Việc bảo quản thuốc thuốc cổ truyền chủ yếu dựa vào kinh nghiệm dân gian như: Phơi, sấy, tẩm, ướp, bảo quản nơi khô ráo [68]. Khi thuốc thuốc cổ truyền có dấu hiệu ẩm mốc thì phơi, sấy để sử dụng lại, điều này là hết sức nguy hiểm vì độc tố của nhiều loài nấm rất độc với gan, thận, tủy xương...

+ Nghiên cứu của Đặng Bích Thủy (2008), tại Kiên Xương - Thái Bình về thực trạng nhiễm nấm và kiến thức, thái độ, thực hành của người dân về ô nhiễm nấm của các sản phẩm sau thu hoạch cho thấy có 35,6% số mẫu lạc, 48,9% số mẫu đỗ tương được bảo quản trong các đúng cách, tỷ lệ nhiễm nấm ở lạc 13,3% và 24,4% mẫu đỗ tương, chỉ có 13,8% người dân hiểu biết đúng cách bảo quản và xử trí khi thực phẩm bị nhiễm nấm [71].

+ Nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn (2018), cho thấy tỷ lệ nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền cao 51,8%, chỉ 20%(12/60) cán bộ y tế kê tên được 1 loài nấm, 10,0% số nhà kho bảo quản thuốc cổ truyền có tốc độ gió 0,5 – 1m/s, 50% số cán bộ y tế phòng vẫn hiểu đúng độ ẩm kho chứa thuốc cần có độ ẩm < 70%, 0,0% số cán bộ y tế hiểu đúng cần kiểm tra thuốc cổ truyền hằng ngày, 25% số cán bộ y tế biết khi kiểm tra thuốc bằng cảm quang thấy [47].

+ Anima J Sirma và CS (2015), nghiên cứu về tình trạng nhiễm aflatoxin do nấm trong ngũ cốc và kiến thức, thái độ, thực hành phòng chống của nấm của người dân tại Kenya gần như 100% người dân không có kiến thức hiểu biết về nấm ở thực phẩm và phương pháp phòng chống nấm [72].

+ Nhiễm aflatoxin trong các sản phẩm gạo, ngô, khoai, sắn, và các sản phẩm thuốc đông dược có tính chất tích lũy theo thời gian ô nhiễm với nấm mốc. Ngay cả con người hằng ngày sử dụng các sản phẩm sữa, bơ, hạt, củ quả, thuốc đông dược aflatoxin tích lũy trong cơ thể, các nhà khoa học tính toán có từ 15 -20% người ung thư gan có liên quan đến aflatoxin. Vì vậy mô hình đánh giá rủi ro với sức khỏe do nhiễm aflatoxin, cụ thể: Một là: Cần có các mô hình phơi nhiễm qua chế độ ăn uống tích hợp mức độ ô nhiễm và dữ liệu tiêu thụ; Hai là cần có các phương pháp giám sát sinh học ở người, định lượng các dấu ấn sinh học của độc tố nấm mốc trong các mẫu sinh học.

4.3. Kết quả can thiệp bằng cải thiện môi trường vi khí hậu trong kho bảo quản thuốc cổ truyền

Các tác nhân nấm gây hư hỏng thuốc cổ truyền khi có điều kiện thuận lợi

như nhiệt độ cao $> 25^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $> 70\%$, tốc độ gió $< 0,5\text{m/s}$ hoặc cao $> 1\text{m/s}$, ánh sáng thiếu, chất lượng nhà kho kém không có các trang thiết bị bảo quản thuốc.... Vì vậy, biện pháp hiệu quả nhất là tạo ra điều kiện môi trường vi khí hậu bất lợi cho nấm phát triển.

Aflatoxin là chất gây ung thư mạnh và gây ra những rủi ro đáng kể đối với an toàn thực phẩm và sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Aflatoxin bao gồm aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin G2 (AFG2) và aflatoxin M1 (AFM1), đặc biệt aflatoxin B1 nổi tiếng về khả năng gây ung thư, được Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC) phân loại là chất gây ung thư ở người. Tiếp xúc lâu dài với aflatoxin thông qua thực phẩm và thức ăn chăn nuôi bị ô nhiễm có thể dẫn đến ung thư gan, suy giảm miễn dịch, suy giảm tăng trưởng và các vấn đề sức khỏe toàn thân khác.

Nhiễm aflatoxin trong các sản phẩm nông nghiệp đối với con người đã trở thành vấn đề sức khỏe toàn cầu, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành và phát triển nấm, các yếu tố ảnh hưởng nhiều nhất là: Thời tiết nóng ẩm, thiếu phương tiện và kỹ thuật bảo quản có vai trò then chốt trong quá trình ô nhiễm nấm trong thực phẩm, quy trình chế biến, vận chuyển và phong tục tập quán sử dụng thực phẩm sau thu hoạch cũng có vai trò quan trọng.

Các nỗ lực giảm thiểu ô nhiễm aflatoxin trước đây chủ yếu dựa vào các phương pháp xử lý hóa học, phân tách vật lý và phân hủy sinh học. Tuy nhiên, những phương pháp này thường đặt ra những thách thức liên quan đến an toàn, hiệu quả và tác động đến chất lượng thực phẩm.

Nấm phát triển mạnh nhất ở điều kiện môi trường phù hợp khi độ ẩm $> 70\%$, nhiệt độ $> 25^{\circ}\text{C}$, tốc độ gió $< 0,5\text{m/s}$ hoặc $> 1\text{ m/s}$, môi trường có đủ dinh dưỡng... vì vậy để bảo quản thuốc cổ truyền tốt cần tạo điều kiện môi trường vi khí hậu có nhiệt độ $< 25^{\circ}\text{C}$, độ ẩm thấp $< 70\%$, không khi môi trường vi khí hậu phải sạch thông thoáng.... vì vậy cần có các trang thiết bị như máy hút ẩm,

quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ, có thể sử dụng các loại tia cực tím, tia hồng ngoại tiêu diệt bào tử nấm trong không khí. Các căn cứ khoa học trên cũng được Đào Thiện và CS (2012), ứng dụng mô hình của Gompertz mô hình hóa và dự đoán quá trình phát triển của nấm mốc nhằm mục đích đánh giá khả năng nảy mầm và phát triển của các loại nấm mốc trên thực phẩm, chế phẩm nông nghiệp...trên cơ sở đó tạo ra các điều kiện bất lợi cho sự phát triển của nấm như: Nhiệt độ thấp làm cho bào tử nấm không thể nảy mầm hoặc kéo dài thời gian nảy mầm... từ đó làm giảm tỷ lệ nhiễm nấm [53]:

Bằng sự đầu tư từ nguồn vốn tự chủ của Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An cho 2 kho bảo quản thuốc cổ truyền, danh mục trang bị gồm quạt thông gió, máy điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm; hộp hút ẩm, máy đo nhiệt độ và độ ẩm. Cải tạo rãnh thoát nước quanh nhà kho, sơn lại tường nhà kho bằng sơn chống thấm. Bổ sung mái chống nóng cho kho thuốc. Thay cửa 2 kho bằng cửa khung nhôm, vách kính màu, cửa có roăng cao su khít, kín. Trang bị các túi hút ẩm ở tất cả các hộp đựng thuốc, thay nhãn của các hộp đựng thuốc. Bệnh viện đã đưa ra quy trình kỹ thuật thực hành thuốc tốt của nhà kho. Tổ chức các đợt kiểm tra định kỳ 1 lần/1 tháng, nội dung kiểm tra mọi khâu nhập, bảo quản và phân phối thuốc cổ truyền trước khi sử dụng cho người bệnh, giấy xác nhận an toàn sinh học của đơn vị cung cấp thuốc. Thành phần đoàn kiểm tra gồm: Đại diện lãnh đạo Bệnh viện, phòng kế hoạch, phòng chất lượng bệnh viện, khoa dược và các cán bộ kho thuốc...qua đó đã cải thiện giảm tình trạng nhiễm nấm ở thuốc cổ truyền.

Kết quả tại các bảng 3.32, trước can thiệp cả 2 kho đều không đạt bất cứ một tiêu chí nào về bảo quản thuốc cổ truyền. Sau can thiệp lắp đặt các trang thiết bị cải thiện điều kiện vi khí hậu cho 2 kho thuốc và tăng cường 12 đợt kiểm tra định kỳ toàn bộ hoạt động của cán bộ nhân viên kho thuốc, kết quả cả 2 kho đều đạt yêu cầu thực hành tốt bảo quản thuốc và an toàn cho 2 kho thuốc (bảng 3.33). Kết quả đánh giá chất lượng kho thuốc, chuẩn hóa quy trình kỹ thuật nhập

thuốc, bảo quản thuốc, cấp phát thuốc sau can thiệp thể hiện trong kết quả các bảng 3.36, bảng 3.37, bảng 3.38 cho thấy: Tỷ lệ nhiễm nấm chung sau can thiệp 12 tháng đã giảm có ý nghĩa thống kê từ 32,94% xuống còn 22,35% với $p < 0,05$. Hiệu quả can thiệp là 32,15%. Tỷ lệ nhiễm nấm ở cả 2 kho tỷ lệ nhiễm nấm giảm có ý nghĩa thống kê: Kho số 1, từ 32,14% xuống 21,43%, $p < 0,05$. Kho số 2, từ 33,72% xuống 23,26%, $p < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu này có cùng kết luận với một số nghiên cứu trong nước và quốc tế về nâng cao chất lượng bảo quản thuốc cổ truyền, giảm thiểu ô nhiễm độc tố của nấm.

- Tại Việt Nam:

Nhiều nghiên cứu đã áp dụng các biện pháp phòng chống nhiễm nấm áp dụng cho tất cả các khâu từ sản xuất, chế biến, phân phối và bảo quản:

+ Nghiên cứu của Đậu Huy Hoàn (2018), sau can thiệp 12 tháng lắp điều hòa, máy hút ẩm, hóa chất chống ẩm mốc, quạt thông gió, đồng hồ theo dõi điều kiện vi khí hậu trong kho và kiểm tra thường xuyên 1 ngày/1 lần tình trạng thuốc 100% nhà kho đạt tiêu chuẩn an toàn cho bảo quản thuốc, tỷ lệ nhiễm nấm giảm từ 51,8% xuống còn 18,99%, hiệu quả can thiệp đạt 63,34% [47].

+ Phan Thị Kim Liên, có nghiên cứu về ảnh hưởng các điều kiện nhiệt độ, hoạt độ nước theo mùa vụ lên sự hô hấp và tổn thất chất khô, tác giả có khuyến cáo người dân nên bảo quản gạo ở hoạt độ nước thấp để hạn chế nấm phát triển và sinh độc tố tránh hao hụt chất lượng gạo [68].

+ Nguyễn Thị Hải (2017), nghiên cứu xử lý ô nhiễm aflatoxin trong thực phẩm bằng acid sorbic kết hợp hấp ướt trong nông sản, kết quả giảm hàm lượng aflatoxin B1 tới 90,8%, aflatoxin B2 tới 84,1% và aflatoxin G 89,21%. Kết quả này cho thấy xử lý aflatoxin trong thực phẩm bằng acid sorbic kết hợp hấp ướt đây là phương pháp làm giảm hàm lượng độc tố do nấm sinh ra rất có hiệu quả và có thể áp dụng rộng rãi tại Việt Nam với lý do dễ thực hiện, rẻ tiền và có

hiệu quả cao [59].

- Trên thế giới:

Tổ chức Nông Lương thế giới khuyến cáo mỗi quốc gia cần có bộ tiêu chuẩn giám sát aflatoxin, kỹ thuật định lượng aflatoxin, ngưỡng an toàn cho phép và đồng thời nâng cao kiến thức của người dân trong phòng chống nhiễm độc tố sinh ra do nhiễm nấm. Mỗi nước cần xây dựng chiến lược kiểm soát độc tố nấm (Ergot Alkaloids) trong ngũ cốc và các thực phẩm có nguồn gốc từ ngũ cốc, kể cả các sản phẩm phục vụ chăn nuôi vì theo chuỗi thức ăn aflatoxin vào cơ thể động vật nuôi, khi người sử dụng chế biến thức ăn các aflatoxin không hề bị phân hủy ở 100°C mà được hấp thu vào cơ thể người từ đó gây ngộ độc mãn với liều tích lũy theo thời gian đủ lớn [26], [54]. Các sản phẩm sau thu hoạch có thể được sử dụng làm thức ăn, nguyên liệu chế biến thực phẩm, làm thuốc...trong quá trình chế biến, bảo quản, vận chuyển, nếu không có điều kiện bảo quản tốt như: độ ẩm cao > 70%, nhiệt độ cao > 25°C, các phương tiện che chắn không kín thì dễ bị xâm nhập của các bào tử nấm xâm nhập. Sau khi xâm nhập các bào tử nấm phát triển nhanh chóng thành các tế bào nấm hoàn chỉnh sẽ sản sinh ra aflatoxin. Mức độ ô nhiễm aflatoxin còn phụ thuộc vào: Thời gian nhiễm nấm; Nhiệt độ môi trường; Dinh dưỡng tại nơi nấm ký sinh và phát triển...[134]. Vì vậy, để giảm thiểu ô nhiễm aflatoxin thì cần tạo ra các điều kiện bất lợi hạn chế tối đa sự phát triển của nấm, như nấm chỉ sinh aflatoxin ở nhiệt độ trên 25°C - 28 °C, khi nhiệt độ < 25°C thì nấm sản sinh ra rất ít aflatoxin, nếu nhiệt độ < 20°C thì nấm gần như không sinh aflatoxin. Vì vậy, WHO khuyến cáo các nước cần có quy trình kỹ thuật chuẩn định lượng aflatoxin giám sát chặt chẽ hàm lượng aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2 là 4 loại aflatoxin có vai trò quan trọng nhất với sức khỏe con người [135], [136], [137]

Năm 2025, Yehia A-G Mahmoud và CS nghiên cứu giải độc aflatoxin

bằng Plasma lạnh. Plasma lạnh tạo ra các gốc oxy phản ứng, có khả năng phân hủy hiệu quả aflatoxin trên bề mặt thực phẩm mà không ảnh hưởng đến tính toàn vẹn dinh dưỡng hoặc an toàn. Kết quả này củng cố các nghiên cứu hiện tại và những tiến bộ trong lĩnh vực giải độc aflatoxin, đồng thời làm nổi bật tiềm năng của công nghệ plasma lạnh trong việc cách mạng hóa các hoạt động an toàn thực phẩm [132].

Hillari Bynum và CS (2023), nghiên cứu aflatoxin và giải pháp an toàn trong quả hồ trăn bằng các kỹ thuật: Giảm thiểu áp lực dịch hại như phun thuốc trừ sâu, giảm số lượng quả còn sót lại sau thu hoạch, thực hiện vệ sinh mùa hằng năm; Kết hợp các biện pháp sinh học; Thực hành nông nghiệp đúng cách, bảo quản đúng cách; Đào tạo nhân lực và thử nghiệm các mẫu thường xuyên tại labo [133]

Các biện pháp nâng cao kỹ thuật bảo quản thuốc cỏ truyền và các sản phẩm nông nghiệp sau thu hoạch là chưa đủ mà cần phát triển đồng bộ các công cụ giám sát từ khâu nuôi trồng, thu hoạch, chế biến và phân phối [26]. Phải nâng cao năng lực giám sát ô nhiễm aflatoxin: Năm 2019, Timothy J. Herrman và CS nghiên cứu các biện pháp nâng cao chất lượng giám sát aflatoxin tại các trạm xay sát lương thực nhằm đưa ra biện pháp giảm thiểu ô nhiễm aflatoxin tại 15 nhà máy ngô tại Kenya nhằm bảo vệ sức khỏe cho 10 triệu dân Kenya. Kết quả sau 5 vòng thử nghiệm độc lập ở các nhà máy đều cho kết quả phát hiện nồng độ aflatoxin từ 5 μg đây là mức giới hạn an toàn tại Kenya. Tác giả đã có kết luận kỹ thuật giám sát aflatoxin có hiệu quả cao ngay cả khi áp dụng cho các tuyến cơ sở sản xuất [112].

KẾT LUẬN

1. Thành phần loài nấm trong một số mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An năm 2023

Nghiên cứu trên 170 mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An 2023 - 2025, kết quả: Tỷ lệ nhiễm nấm 32,94%. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc nam 28,40% và thuốc bắc 37,10%. Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc có nguồn gốc từ rễ cao nhất (40,30%). Tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc làm từ thân 23,68% và các vị thuốc từ cành-lá- hoa-quả 32,07%.

Trong 56 mẫu nhiễm nấm, có 50 mẫu nhiễm 01 loài, 5 mẫu nhiễm 2 loài, 01 mẫu nhiễm 3 loài; Tổng số có 63 chủng nấm thuộc 16 loài; Xác định được tên loài của 61 chủng, 2 chủng chưa xác định được tên loài. Trong đó 28 mẫu nhiễm *Aspergillus* chiếm 44,44%(28/63), gồm 8 loài trong đó *A. niger* chiếm tỷ lệ cao nhất 10/28(15,87%), *A. flavus* và *As. chevalieri* chiếm 5/28 (7,94%). Đã xác định được 5 giống nấm khác gồm *Rhizopus* spp; *Penicillium* spp; *Fusarium* spp; *Phoma* sp, *Cladosporidium*, chiếm 55,56%(35/63) tổng số mẫu phân lập được, trong đó *Rhizopus* chiếm tỷ lệ cao nhất 25,39%(16/35), *Penicillium* spp có 3 loài; *Fusarium* spp có 1 loài, *Cladosporium* có 1 loài; 01 mẫu *Phoma* spp chưa xác định được loài.

2. Tỷ lệ nhiễm aflatoxin, thành phần, nồng độ các độc tố aflatoxin B₁, aflatoxin B₂, aflatoxin G₁, aflatoxin G₂ trong các mẫu thuốc cổ truyền tại Bệnh viện Y học Cổ truyền tỉnh Nghệ An

Tỷ lệ nhiễm aflatoxin chung là 9,41%(16/170), trong 16 mẫu nhiễm aflatoxin, có 9 mẫu nhiễm 1 loại aflatoxin (56,25%); 5 mẫu nhiễm 02 loại aflatoxin (31,25%), 2 mẫu nhiễm 3 loại aflatoxin (12,50%). Tổng cộng có 25 lượt mẫu nhiễm aflatoxin chiếm 14,71%(25/170), trong đó tỷ lệ mẫu nhiễm B₂ cao nhất 7,06%(12/170), tiếp đến là tỷ lệ mẫu nhiễm G₁ chiếm 3,53%(6/170), thấp nhất là mẫu nhiễm G₂ (1,76%; 3/170). Trong số 25

mẫu nhiễm aflatoxin tỷ lệ nhiễm aflatoxin B2 cao nhất 48,0%(12/25), nhiễm aflatoxin G1 là 24,0%(6/25), nhiễm aflatoxin B1 là 16,0%(4/25), thấp nhất là nhiễm aflatoxin G2 12,0%(3/25). Tỷ lệ nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền có nhiễm nấm là 19,64%(11/56), ở các mẫu không nhiễm nấm 4,39%(5/114).

Có liên quan giữa nhiễm nấm và nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền [OR95%CI:5,165(1,69-15,70)]. Có liên quan giữa nhiễm nấm *Aspergillus* và nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền OR95%CI: 4,533(1,47-13,97). Có liên quan giữa nhiễm các loài nấm khác với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền OR95%CI:4,704(1,623-13,636). Có liên quan giữa nhiễm nấm với nhiễm aflatoxin ở các mẫu thuốc cổ truyền là thuốc bắc OR95%CI:7,373(1,621-33,542).

Hàm lượng aflatoxin trung bình là 1,89 (ng/g), cao nhất là hàm lượng B1(2,38 ng/g), tiếp đến là G1(2,05 ng/g), 2 loại aflatoxin G2 và B2 có hàm lượng thấp. Có 62,5%(10/16) mẫu thuốc cổ truyền nhiễm aflatoxin vượt 0,5 bpp.

3. Kết quả can thiệp phòng chống nhiễm nấm ở các mẫu thuốc cổ truyền

Trước can thiệp cả 2 kho đều không đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc cổ truyền gồm không đạt điều kiện nhiệt độ, độ ẩm, tốc độ gió. Sau can thiệp 12 tháng cả 2 kho đều có điều kiện vi khí hậu nhiệt độ trung bình ở 4 góc kho và giữa trung tâm kho là $< 25^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $< 70\%$, tốc độ gió 0,5m/giây đến 1 m/giây, đạt yêu cầu điều kiện bảo quản thuốc. Tỷ lệ nhiễm nấm chung ở thuốc cổ truyền của 2 kho sau can thiệp 12 tháng thay đổi có ý nghĩa thống kê từ 32,94% xuống 22,35%, $p < 0,05$, hiệu quả can thiệp là 32,15%. Tỷ lệ nhiễm nấm *Aspergillus* sau can thiệp 12 tháng giảm từ 16,47%(24/170) xuống 6,47%(11/170), hiệu quả can thiệp 54,15%.

KIẾN NGHỊ

1. Đối với các kho bảo quản thuốc cổ truyền cần tạo ra môi trường bảo quản thuốc tốt nhất, tức là tạo môi trường bất lợi nhất đối với sự phát triển của nấm, cần trang bị các máy điều hòa nhiệt độ, máy hút ẩm, túi hút ẩm nhằm duy trì tốc độ gió luôn trong khoảng từ 0,5m/s – 1m/s, nhiệt độ trung bình trong kho $< 25^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $< 70\%$.

2. Định kỳ kiểm tra chất lượng thuốc bằng cảm quang, kịp thời phát hiện mẫu thuốc nhiễm nấm và cần loại bỏ các vị thuốc đó không sử dụng cho người bệnh. Tuân thủ quy trình thực hành thuốc tốt.

TÍNH KHOA HỌC, TÍNH MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Đề tài đã áp dụng các phương pháp nghiên cứu có tính khoa học chuẩn mực hiện đang áp dụng rộng rãi tại Việt Nam và thế Giới như: Phương pháp nghiên cứu mô tả có phân tích, phương pháp nghiên cứu thực nghiệm tại labo với các kỹ thuật hiện đại như PCR và giải trình tự gen định danh loài nấm, kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao định lượng aflatoxin.

Mặt khác, đề tài đã áp dụng phương pháp phân tích và xử lý số liệu chuẩn mực đáng tin cậy như: Stata, E-piinfo, SPSS...do các chuyên gia có kinh nghiệm thực hiện. Vì vậy các kết quả rất có giá trị, có độ tin cậy cao.

CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN KẾT QUẢ CỦA LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

- 1 Hồ Văn Thắng**, Nguyễn Thị Kim Dinh, Nguyễn Thị Nga, Dương Đình Chinh, Cao Bá Lợi (2025), Thực trạng nhiễm nấm trên các vị thuốc đông dược tại Bệnh viện Y học cổ truyền tỉnh Nghệ An, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 67(2), Tr.206-211.
- 2 Hồ Văn Thắng**, Nguyễn Thị Kim Dinh, Nguyễn Thị Nga, Dương Đình Chinh, Cao Bá Lợi (2025), Đặc điểm nhiễm aflatoxin trên các vị thuốc đông dược tại Bệnh viện Y học cổ truyền tỉnh Nghệ An 2023, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 67(2), Tr. 128-132
- 3 Hồ Văn Thắng**, Nguyễn Thị Kim Dinh, Nguyễn Thị Nga, Dương Đình Chinh, Cao Bá Lợi (2025), Một số yếu tố liên quan nhiễm aflatoxin ở các vị thuốc đông dược tại Bệnh viện Y học cổ truyền tỉnh Nghệ An 2023, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 67(2), Tr.154-158

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương (2023), *Ký sinh trùng Y học*, Sách đào tạo sau đại học, NXB Y học Hà Nội, Hà Nội, 330 Trang.
2. Bộ Y tế (2009), *Dược học cổ truyền*, Sách đào tạo bác sĩ chuyên khoa Y học cổ truyền, NXB Y học Hà Nội, Tr.13-14.
3. Quốc Hội Nước Cộng Hòa Xã Hội Chủ Nghĩa Việt Nam (2016), Luật Dược, Tr.1
4. VP. Masaka, N Ndlovu, RS Tshalibe end et al (2022), Prevalence of aflatoxin Contamination in Peanuts and Peanuts Butter from an Infomat Market, Harare – Zimbabwe, *International Journal of Food Science* 3671078,doi10.115/2022/3761078
5. Cornell University, USA (2013), *Aflatoxins: Ocurrence and Health Risks*, Tekbooke
6. David G. Schmele III and et al (2013), Mycotoxins in Crops: A threat to Human and Domestic Animal Health, *Virgnia Polytechnic Institute and State University Blachsburg. VA*.
7. Kaaya N.A.L, H.L Warren et al (2005), A review of past and present Research on aflatoxin in Uganda, *African Journal of Food Agriculture and Nutritional Development*, Volume.5, No.1.
8. Mina Nan, Huali and Yang Bi (2022), Contamination Detection and Control of Mycotoxins in Fruits, *The Toxins*, Vol.11(14), p.309.
9. Viện Công nghệ thực phẩm (2023), *Ô nhiễm độc tố nấm Ergot alkaloids trong các sản phẩm ngũ cốc và chiến lược kiểm soát*, Tài liệu dịch từ Fri Admin (<https://firi.vn./2023/05/23/author.caobach.>)
10. Sofia Agriopoulou (2021), Ergot Alkaloids Mycotoxins in Cereals and Cereal – Derived Food Products: Characteristics, Toxicity, Prevalence, and Control Stratategies, *The Jounal of Agronomy*, p.13
11. Nguyễn Đình Lâm, Nguyễn Văn Chuyên, Nguyễn Văn Ba và CS (2025), Thực trạng nhiễm aflatoxin B1 trong gạo và sản phẩm từ gạo ở Cần Thơ,

năm 2024, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số.66(5).

12. Bộ Y tế (2020), *Căn cứ hướng dẫn được diễn Việt Nam V*, Sách hướng dẫn bảo quản thuốc, Tài liệu dịch từ WHO – Guidelines for quality control of medicinal plant materials.
13. Bùi Thị Mai Hương, Lê Danh Tuyên (2012), Ô nhiễm độc tố vi nấm trong ngũ cốc: Nguy cơ về sức khỏe của người dân tỉnh Lào Cai, *Tạp chí Y học Dự phòng*, Tập 22, Số 2(128), Trang 33 - 38.
14. Nguyễn Đình Nga, Nguyễn Thị Kiều Khanh, Văn Phở (2012), Khảo sát mức độ nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong một số dược liệu bán ở Quận 5 – Thành phố Hồ Chí Minh, *Tạp chí Y học Thành Phố Hồ Chí Minh*, “Tập 16”, Phụ bản số 1, Trang 93 - 96.
15. World Health Organization (2018), *Joint Fao/WHO Food Standards Programme Codex Committee On Contaminants In Foods*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 178 pp.
16. Ngân hàng Thế giới (2017), Quản lý nguy cơ an toàn thực phẩm ở Việt Nam – Những thách thức và cơ hội, *Ngân hàng Thế giới- Public Disclosure Authorized*, p.71.
17. Mary T. Fletcher and Gabriele Netzel (2020), Food Safety and Natural Toxins, *Toxins*, Vol.12, p.236.
18. Trần Xuân Mai và CS (2004), *Vi nấm y học*, Sách đào tạo bác sỹ y khoa Trường đại học Y Dược Thành Hồ Chí Minh, Sách tham khảo, trang 107-120
19. Trần Quang Phục, Hồ Văn Thắng, Đỗ Thị Thanh Thủy (2022), Nghiên cứu tỷ lệ nhiễm nấm ở các vị thuốc đông dược tại Bệnh viện Đông y tỉnh Nghệ An năm 2019, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 63(6).
20. Đinh Thị Thanh Mai, Võ Thị Hiền Vũ Văn Thái và CS (2022), Thực trạng nhiễm nấm *Aspergillus*, *Penicillium* ở các vị thuốc cổ truyền tại một số cơ sở kinh doanh nội thành Hải Phòng năm 2024, *Tạp chí Y học sức khỏe*, Tập.3(1), trang.152 - 155
21. Keter L, Too R, Mwikwabe N, Mutai C, Orwa J, Mwamburi L, et al.(2017), Nguy cơ nấm liên quan đến aflatoxin và fumonisin trong các

- sản phẩm thảo dược trên thị trường Kenya. Sci World J. 2017:1892972. 10.1155/2017/1892972.
22. Trần Trịnh Công, Tạ Mạnh Hùng, Lê Thị Thu Hương (2020), Nghiên cứu mức độ ô nhiễm các loài của chi *Aspergillus* Fr: Fr và aflatoxin trên thuốc liên nhục (*Semen nelumbinis nuciferae*) đang lưu hành trên địa bàn Hà Nội 2020, *Tạp chí Y Dược học*, Số.1(60).
 23. Bộ Y tế (2011), *Ký sinh trùng*, Giáo trình đào tạo bác sỹ đa khoa y học cổ truyền, NXB Y học Hà Nội, Hà Nội, 238 Trang.
 24. Ni Made A., Tarini et al (2010), Development of multiplex -PCR assay for rapid detection of *Candida* sp, *Med J Indones*, Vol.19, No.2.
 25. P.V.C. Yong and et al (2008), Molecular Identification of *Candida* orthopsilosis Isolated from Blood Culture, *Mycopathologia*, Vol. 165:81-87, DOI10.1007/s11046-007-9086-8.
 26. Tổ chức Nông Lương Thế giới (2014), *Mycotoxin - Độc tố trong nấm mốc*, Tài liệu dịch.
 27. Samina Ashiq (2014), Natural occurrence of mycotoxin in food and feed Pakistan perspective, *Comprehensive Reviews*, Vol.0, pp.1-11. Doi.10.1111/1541-4337.12122.
 28. Dương Thông, Nguyễn Hoài Nam (2003), *Chẩn đoán và điều trị ngoại khoa u nấm phổi do Aspergillus*, Sách tham khảo giảng dạy đại học và sau đại học, Tổng Hội Y-Dược học Việt Nam, Tập (2), Tr.13-19.
 29. Đại học Y-Dược Thành phố Hồ Chí Minh (2008), *Bệnh nấm phổi - Nội khoa hô hấp*, Sách đào tạo bác sỹ y khoa, NXB Y học Chi nhánh Thành phố Hồ Chí Minh,
 30. L. Klingspor and S.Jalal (2006), Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real -time PCR, *Clinical Microbiology and Infection Diseases*, Volume 12 Number 8, August, pp.745-753.
 31. S.H Mirhendi et al (2001), A PCR-RFLP Method to Identification of the important Opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus famigatus* and *Fusarium solani*, *Iranian J. Publ. Health*, Vol. 30, Nos. 3-4, pp.103-106.

32. Tạ Thị Thu Lan, Trần Trịnh Công (2024), Nghiên cứu mức độ nhiễm 2 loài *Aspergillus flavus* link và *Aspergillus parasiticus* speare trên dược liệu bách bộ từ một số hiệu đông dược ở Hà Nội. *Tạp Chí Y học Cộng đồng*, 65(5)
33. Lê Quang Hạnh Thư, Từ Minh Thành. (2022), Tình hình nhiễm vi nấm trong một số dược liệu dạng quả sậy khô đang lưu hành ở Quận 5, Tp. Hồ Chí Minh. *Tạp chí nghiên cứu khoa học và công nghệ - Journal of Science and Technology*, Số.4(3):p.8.
34. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (2010), Introduction to Food- and Airborne Fungi, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, *The Netherlands*
35. Magrit Hulmel., Corina Baust et al (2004), Detection of *Aspergillus* DNA by a nested PCR assay is superior to blood culture in an experimental murine model of invasive aspergillosis, *Medizinische Klinik, Universitäts Klinikum Mannheim*, Margit Hummel: margit.hummel@med3.ma.uni-heidelberg.de
36. Tăng Xuân Hải, Quế Anh Trâm (2019), Nghiên cứu kiến thức, thực hành phòng chống nhiễm nấm mốc cho dược liệu của cán bộ y tế tại một số bệnh viện thuộc tỉnh nghệ an, hiệu quả một số biện pháp can thiệp, *Tạp Chí Y học Cộng đồng*, vol.63(2).
37. White .P.L., Bretagne .S., Klingspor . L. (2006), *Aspergillus PCR: one step closer to standardization*, PubMed –indexed for Medlin, niversity Hospital of Wales, Health Park, Cardiff CF 144XN, London, Kingdom.
38. Dirina Pickova (2021),Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicirty and Ways to Mitigation, *The Toxins*, Vol.13, p.399.
39. Pitt JI, Hocking AD. (2009), Fungi and Food Spoilage. 3rd ed. *New York: Springer*.
40. Nguyễn Công Minh, Đồng Lưu Ba, Phạm Thọ Tuấn Anh và CS (2000), U nấm phổi do *Aspergillus*, Chẩn đoán và Điều trị tại Bệnh viện Chợ Rẫy, *Tạp chí Ngoại khoa-Tổng hội Y-Dược học Việt Nam*, Tập(1), Tr.5-16.

41. Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thị Yến, Trần Thị Kiều Anh (2016), Định lượng aflatoxin M1 trong sữa thô bằng phương pháp LC-MS/MS, *Tạp chí Khoa học trẻ*, Số 2(1), Trang 1-7.
42. Lý Thu Hương (2012), *Mức độ nhiễm vi nấm sinh ochratoxin A trong đất và rễ cây cà phê ở một số vùng trồng cà phê trọng điểm*, Luận án tiến sỹ chuyên ngành Vi sinh vật, Đại học Khoa học tự nhiên- Đại học Quốc gia Hà Nội.
43. FAO. (2004), Mycotoxin regulations. FAO.
44. Bộ Y tế (2021), *Ban hành danh mục thuốc đông y được chỉ định kê đơn trong bảo hiểm y tế trong*, Thông tư 13/2021/TT-BYT ngày 15/10/2021
45. Roua Gabriel Popescu., Andreea Luminita Rawdulescu, Sergiu Emil Georgescu and Anca Dinischiotu (2022), aflatoxin in feed: Types Metabolism, Health Consequences in Swine and Mitigation Strategies *The Toxins (Basel)*, Vol.14(12), doi:10.3390/Toxins 14120853.
46. Nguyễn Thị Xuân Sâm, Trần Thanh Thủy, Lê Quang Hòa (2020), Xác định nấm mốc sinh độc tố Aflatoxin trong các mẫu ngô, lạc và đất trồng bằng kỹ thuật PCR, *Hội nghị Khoa học lần thứ 20-Đại học Bách khoa Hà Nội*, Tr.199-204.
47. Đậu Huy Hoàn (2018), *Thực trạng nhiễm vi nấm, aflatoxin trong một số vị thuốc đông dược và kiến thức, thái độ, thực hành bảo quản thuốc của cán bộ y tế tại tỉnh Nghệ An, hiệu quả can thiệp*, Luận án tiến sỹ y học, Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương, Hà Nội.
48. Nguyễn Thu Mai, Nguyễn Bảo Lộc, Lâm Thị Việt Hà (2009), Phân lập và định danh sơ bộ một số loài *Aspergillus* trên hạt đậu phộng ở chợ Xuân Khánh – Thành phố Cần Thơ, *Tạp chí khoa học – Đại học Y Dược Cần Thơ*, Số.11, Trang 301-309.
49. Nguyễn Vũ Thuận, Đặng Thị Oanh và CS (2022), Khảo sát mức độ nhiễm nấm mốc và aflatoxin trong ngô, lạc ở một số hộ gia đình thuộc 3 huyện EaH'leo, CưM'Ga, Krông Pắc tại tỉnh Đắk Lắk, *Tạp chí kiểm nghiệm và an toàn thực phẩm*, Vol.5(3), pp.415-421.

50. Lê Thị Hoàng Yến, Nguyễn Thị Minh Huyền, Nguyễn Thị Thanh Mai và CS (2025), Đánh giá chất lượng dinh dưỡng và mức độ ô nhiễm aflatoxin của sản phẩm tương truyền thống, *Tạp chí Kiểm nghiệm và an toàn thực phẩm*, Số.4, trang.316 -322.
51. Bộ Y tế (2008), *Ký sinh trùng thực hành*, Sách đào tạo cử nhân kỹ thuật xét nghiệm y học, NXB Y học Hà Nội, Hà Nội, 239 Trang.
52. Bộ Y tế (2015), *Ban hành Danh mục thuốc Đông y, thuốc từ dược liệu và vị thuốc y học cổ truyền thuộc phạm vi thanh toán của quỹ bảo hiểm y tế*, Thông tư 05/2015/TT-BYT.
53. Đào Thiện, Trần Thanh Hòa và CS (2012), Mô hình hóa với các loại nấm mốc, *Tạp chí khoa học và phát triển*, Số.5, Tập.10.
54. T.D Cardoma, S.G Hangantileke and et al (2013), Aflatoxin Research on grain in Asia – Its problems and possible solutions, *FAO*
55. Pham Diệu Thùy (2012), Ngộ độc thực phẩm ở người do độc tố nấm mốc, *Báo cáo khoa học tại Đại học Nông Lâm Thái Nguyên*.
56. Bretagne S., Costa J.M., Mamorat – Khuong A end et al (2006), Detection of *Aspergillus* DNA by PCR in Bronchoalveola Lavage Fluid, *PubMed-Medicine, Parasitologie-Mycologie*, Hopital Henri Mondor, Cretell, Prace
57. J.W. Bennett, M.Klich et al (2003), Mycotoxins, *Lin Microbiol Rev*, Vol16(3), pp.497-516.
58. Bộ Y tế (2012), *Kỹ thuật xét nghiệm vệ sinh an toàn thực phẩm*, Sách đào tạo kỹ thuật viên xét nghiệm, NXB Y học Hà Nội, 226 Tr.
59. Nguyễn Thị Hải và CS (2017), Nghiên cứu hàm lượng và xử lý aflatoxin trong nông sản, phụ phẩm chế biến bằng acid sorbic và hấp ướt ở áp suất cao, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, Số 112, Tập 12, Trang 119-124.
60. Đậu Ngọc Hào, Lê Thị Ngọc Diệp (2003), *Nấm mốc và độc tố aflatoxin trong thức ăn chăn nuôi*, Sách tham khảo, Nhà Xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
61. Nguyễn Ngọc Kim Vy (2019), Aflatoxin - Độc tố nguy hiểm gây ung thư gan, *Tạp chí khoa học và đời sống*, số 12, Tr51-52

62. Pratiwi C, Rahayu WP, Lioe HN, Herawati D, Broto W, Ambarwati S. (2015), Effect of temperature and relative humidity on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production on soybeans. *Int Food Res J*. Vol.22(1):pp.82–87.
63. Wei X, Zhang Y, Lu L (2015), The molecular mechanism of azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: from bedside to bench and back, *Journal of Microbiol*, Vol53(2), pp.91-9.
64. Dubey LK, Moeller JB, Schlosser A, Sorensen GL and Holmskov U (2015), Chitin enhances serum IgE in *Aspergillus fumigatus* induced allergy in mice, *Author information, Journal of Immunobiology Japan*, PMID: 25634077
65. White .P.L., Carlo Mengoli et al (2011), Evaluation of *Aspergillus* spp PCR Rotocal for Testing Serum Specimens, *Journal of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology.
66. Peter J, Delves I, Seamus J, Martin Dennis, R. Burton I van M.Roitt (2017), Roitts Essential Immunology, *Wiley Blackwell*, 541p.
67. Abdoulie Jallow, Huali Xie, Xiaoqian Tang and Zhang Qi (2020), Worldwide aflatoxin contamination of agricultural products and foods: From occurrence to control, *Compr Rev Food Scis Food Saf*, Vol. 20/.pp.2332 -2381.
68. Phan Thị Kim Liên, Trịnh Đức Tuấn, Bùi Duy Ninh (2019), Ảnh hưởng của nhiệt độ và hoạt độ nước lên sự hô hấp và tổn thất chất khô (Dry matter Losses-DML) trên gạo bị nhiễm *Aspergillus flavus*, *Tạp chí Hóa học – Công nghệ thực phẩm*, Số.18, tr.315-320.
69. Wang Y, et al.(2022), Effect of environmental factors on aflatoxin production in upland rice seeds inoculated with *Aspergillus flavus*, *Food and Chem Toxicol*.
70. Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B1: a review, *Food Chem Toxicol*.(2019); Vol.124: pp.81–100.
71. Đặng Bích Thủy, Phạm Ngọc Khái (2008), Tình hình nhiễm nấm mốc trong lạc, đỗ tương và kiến thức, thực hành về phòng chống nhiễm nấm

trong thực phẩm của người dân một số xã huyện Kiến Xương, Thái Bình, *Tạp chí Dinh dưỡng và Thực phẩm*, Tập 4, Số 3.

72. Anina J Sirma, Elizabeth O Ouko, Gatwiri Murithi et al (2015), Prevalence Of aflatoxin contamination in cereals from Nandi County Kenya, *Int. Journal Agric, Sciences and Vetery Medicine*, Vol.3(3).
73. Magan N, Aldred D. (2007), Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain, *Int J Food Microbiol*, Vol.119(1–2):pp.131–139.
74. Gong A, et al. (2016), Current strategies in controlling *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination. *Sustainability*, Vol.16(8):p.3171.
75. Elisabeth Streit, Karin Naehrer et al (2012), Ines Rodrigues and Gerd Schatzmaryr Mycotoxin occurrence in feed and raw materials worlde: Long –term analisis with special focus on Europe and Asia, *Review Accepted article published*, Doi.10.1002/Jsfa.625.
76. Lee HJ, et al. (2014), Occurrence of aflatoxin in herbal medicine, *Food Control*.
77. Wild CP, Gong YY. (2010), Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, Vol.31(1):pp.71–82.
78. Danso, S.J., et al. (2016). Knowledge and practices regarding aflatoxin contamination in Ghanaian households.
79. Wu F, et al. (2014), Aflatoxin exposure and public health interventions: A global perspective.
80. Yu X, et al. (2018), Fungal contamination in traditional Chinese medicines, *Journal of Applied Microbiology*.
81. Xi-Chun Wang, Hai-Xin Fan, Meng-Xue Fan et al (2016), A sensitive Immunochromatographic assay using colloidal gol - antibody probe for rapid detection of fumonisin B1 on corn, *Journal of Food Additives & Contaminants: Part A*, Doi10.1080/19440049.1213429.
82. Hyang Sook Chun, Hyun Ee Ok, Hyun Jung Kim and et al (2006), Risk Assessment of aflatoxin in food products consumed in South Kerea, *Techbook*, Doi:10.1051/IUFoST:2006045.pp.1796-1809.

83. Muhammad Sajid, Abdl-Nasser Kawde and Muhammad Dau (2014), Designs formats and application of lateral flow assay: A literature review, Original Article, *Journal of Saudi Chemical Society*.
84. Andre El Khoury, Ali Atoui, Toufic Rizk and et al (2011), Defferentiation Between *Aspergillus flavus* and *A Aspergillus parasiticus* from pure culture and aflatoxin-Contaminated grapes using PCR-RFLP analysis of aflr-aflj intergennic specer, *Journal of food science*, Vol.76(4), pp.247-253.
85. Keng Wen Lien, Xin Wang, Min Hsiung Pan, Min Pei Ling (2019), Assesing Aflatoxin Exposure Risk from Peanuts and Peanuts Products Improrted to Taiwan, *The Toxins*, Vol.11(80), pp.1-9.
86. Rizzo, I., Vedoya, G., Maurutto, S., Haidukowski, M., & Varsavsky, E. (2004), Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. *Microbiological Research*, Vol.159(2), pp.113–120.
87. Khazaeli P., Mehrabani M, Heidari MR., Asadikaram G., Lari Najafi M. (2021), Prevalence of aflatoxin contamination in herbs and spices in different regions of Iran, *Iran Jounal Public Health*, Vol.46(11):pp.1540–1545.
88. Ajfand (2016), Africa Scholarly Science Communications Trust, African Jounal of Food Agricuture, *Nutrition and Development*, Vol.16(3), pp.10992-11003.
89. Lê Văn Giang (2016), Khảo sát ô nhiễm aflatoxin trong một số nông sản tại miền Bắc Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thực phẩm*.
90. Phạm Thị Ngọc Lan, Ngô Thị Tuyết Mai (2012), Khảo sát ô nhiễm vi sinh vật trong một số thực phẩm trên địa bàn thành phố Huế năm 2010-2011, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, số.73(4), Trang.137-145.
91. Huong Bui Thi Mai, Le Danh Tuyen, Do Huu Tuan and Leon Brimer (2016), Dietary exposure to aflatoxin B1, ochratoxin A and fumisisins of adults in Lao Cai provice, Viet Nam: A total dietary study approach, *Food and Chemical Toxicology*, *Jounal hompage*, Vol.98, pp.127-133.
93. C.DallAsta and P.Battialani (2016), Fumonisin and their modified Forms a matter of concern in future scenario, *World Mycotoxin Jounal*, Vol.9(5), pp.727-739.

93. Golsun Demirel, Buket Alpertunga and Sibel Ozden (2014), Role of Fumonisin B1 on DNA methylation changes in rat kidney and liver cells, *Original Article, Pharmaceutical Biology, Infoma healthcare, Inc*, Doi:10.3109/13880209.2014.976714.
94. Nguyễn Thị Hà Bình, Nguyễn Ngọc Sơn, Nguyễn Thị Lan, Trần Cao Sơn (2020), Tình trạng nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm tại một số địa phương Miền Bắc Việt Nam năm 2019, *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, Số 3(3), Trang 183-190
95. Lê Bách Quang và CS (2010), *Kỹ thuật ký sinh trùng*, Giáo trình giảng dạy đại học, Học viện Quân y, NXB Quân đội nhân dân, tr:310-319.
96. Nguyễn Văn Minh và CS (2019), Khảo sát tình trạng nhiễm nấm mốc trong một số vị thuốc đông dược tại các cơ sở kinh doanh dược liệu. *Tạp chí Y học Việt Nam*.
97. Yu J. (2012), Aflatoxin biosynthesis: insights from genomics. *Toxins*, Vol.4(11):1024–1057.
98. Đại học Y Hà Nội (2012), *Ký sinh trùng y học*, Sách đào tạo bác sỹ, NXB Y học, Hà Nội, 343 trang.
99. Amada Anater, Lara Manyes, Giuseppe Meca and et al (2016), Mycotoxins and their consequences in aquaculture: A review, *Journal of Homepage, Aquaculture*, Vol 451, pp.1-10.
100. Manish Adhikari, Bhawana Negi, Neha Kaushik and et al (2017), T-2 Mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies, *Journal of Oncotarget*, Vol.8(no20), pp.33933-33952.
101. Elif Burcu Bahadır., Mustafa Kemal Sezginturk (2016), Lateral Flow Assays: Principles, Designs and Labels, *Techbook Accepted Manuscript*, pp.1-44.
102. Ravikant Shekhar, Vinay B Raghavendra, P Rachitha (2025), A comprehensive review of mycotoxins, their toxicity, and innovative detoxification methods, *Toxicol Rep*, Vol:14:101952.
103. Đỗ Như Bình (2018), *Nghiên cứu tạo kháng thể kháng độc tố vi nấm Fumonisin và chế tạo que thử phát hiện nhanh độc tố ở quy mô phòng thí nghiệm*, Luận án tiến sỹ y học, Viện Sốt rét – KST – CTTU’.

104. Nguyễn Thị Hải (2018), Nghiên cứu sử dụng thiết bị sắc ký lỏng HPLC 1200 để phân tích hàm lượng aflatoxin trong một số loại nông sản thực phẩm, *Viện Khoa học sự sống*, Kết quả Đề tài khoa học trường Đại học Nông Lâm.
105. Yuan-Kai Wang, Yi-Bo Shi, Qi Zou and et al (2013), Development of a Rapid and simultaneous immunochromatographic assay for the determination of zearalenone and fumonisin B1 corn, wheat and feedstuff samples, *Journal of Food Control*, Vol.31, pp.180-188.
106. Sumei Ling, Rongzhi Wang, Xiaosong et al (2015), Rapid detection of fumonisin B1 using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples, *Journal homepage, Elsevier – Toxicon*, Vol.108, pp.210-215.
107. Payne GA, Brown MP. (2019), Aflatoxin biosynthesis. *Annu Rev Phytopathol*, Vol.36:329–362, [Rushing BR, Selim MI. Aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol*, Vol.124:pp.81–100.
108. Magan N, Aldred D. (2007), Conditions affecting aflatoxin production. *Int J Food Microbiol*, Vol.119:pp.131–139.
109. Nguyễn Thành Duy (2025), *Nghiên cứu phương pháp sắc ký khí lỏng hiệu năng cao đầu dò huỳnh quang để phân tích đồng thời aflatoxin b1, B2, G1, G2 trong một số loại thực phẩm*, Luận án tiến sỹ khoa học vật chất, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
110. Bộ Y tế (2011), *Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia đối với giới hạn ô nhiễm độc tố vi nấm trong thực phẩm*: QCVN 8-1:2011/BYT.
111. Matthew Atongbilk Achaglinkame., Nelson Opoku., Francis Kweku Amagloh (2017), Aflatoxin contamination in cereals and legumes to reconsider usage as complementary food ingredients for Ghanaian infants: A review, *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*, Vol.10, pp.1-7.
112. Timothy J Herrman, Vivian Hoffmann, Anne Muiruri and Cindy McCormick (2020), Aflatoxin Proficiency Testing and Control in Kenya, *Journal of Food Protection*, Vol.83, pp.142-146.

113. Jinyi Yang, Jing Li, Yueming Jiang and et al (2014), Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products, *Critical Reviews in Food science and Nutrition*, Vol.54,pp.64-83.
114. Saba Shaberr, Shahzad Asad, Atif Jamal and Akhatar Ali (2022), Aflatoxin Contaminntion, Ist Imfact and Management Stratagies: An Updated Review, *The Toxin*, Vol.14, p.307
115. Junior Bernardo Molina-Hernandez , Carlos David Grande-Tovar , Lilia Neri, Johannes Delgado-Ospina, Massimiliano Rinaldi, Gustavo Adolfo Cordero-Bueso (2025), Enhancing postharvest food safety: the essential role of non-thermal technologies in combating fungal contamination and mycotoxins, *Front Microbiol*,11:16:1543716.
116. Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương (2025), *Phương pháp phân tích số liệu thống kê y sinh học*, Sách đào tạo sau đại học, Nhà xuất bản Y học, 243 trang.
117. AOAC. (2016), Official Methods of Analysis. 20th ed. AOAC.
118. Shephard GS. (2009), Determination of mycotoxins, *Food Addit Contam.*
119. Sulyok M, Krska R (2010), Schuhmacher R. LC-MS/MS analysis of mycotoxins. *Anal Bioanal Chem.*
120. Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương (2025), *Phương pháp nghiên cứu khoa học*, Giáo trình đào tạo sau đại học, NXB Y học, 243trang.
121. Tạ Thu Lan, Trần Trịnh Công (2024), nghiên cứu mức độ nhiễm 2 loài *Aspergillus flavus* link và *Aspergillus parasiticus* speare trên dược liệu bách bộ từ một số hiệu thuốc y học cổ truyền ở Hà Nội, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 65(5).
122. Abhishek Kumar., Hardik end et al (2026), Nhiễm aflatoxin trong cây trồng thực phẩm, *Tài liệu dịch từ The Nature Link*
123. Trần Trịnh Công, Lê Thị Thu Hương, Tạ Mạnh Hùng và CS (2025), Nghiên cứu mức độ nhiễm các loài của chi *Aspergillus* Fr.:Fr. và aflatoxin trên vị thuốc liên nhục (*Semen Nelumbinis nuciferae*) đang lưu hành trên

địa bàn Hà Nội 2025, *Tạp chí Y Dược học*, Tập.60(1), Tr.1-3.

124. Nguyễn ngọc Kim Vy (2022), aflatoxin – Độc tố nguy hiểm gây ung thư gan, *Đại học California – Hoa Kỳ*, Tài liệu dịch.
125. Elias Oyesigye, Carla Cervini, Abimbola Oluwakayode, George Mahuku (2024), First evidence on the occurrence of multi-mycotoxins and dietary risk exposure to AFB1 along the cassava value chain in Uganda, *Mycotoxin Res*, Vol.40(4):693-708.
126. Samrand Reshadi, Roshanak Daie Ghazvini, Seyed Jamal Hashemi, Heydar Bakhshi, Pegah Ardi, Nafiseh Shakibamehr, Mahdi Babaie, Shojaat Dashtipour & Zahra Rafat, (2024), Determination of Aflatoxins B1, B2, G1, and G2 concentrations in cheese puffs made from corn flour in Iran, *Scientific Reports volume*, Vol.15, Article number:18854.
127. Fei Tian, So Young Woo, Sang Yoo Lee end et al (2022), Mycotoxin in soybean – based foods fermented with filamentous fungi: Occurrence preventive strategies, *Comprehensive Reviews in Food science food Safety - Wiley onlielibrary*, Vol.21:pp.5131-5152.
128. Dizhe Wei, Yao Wang and et al (2017), Survery of alternaria Toxins and Other Mycotoxins in Dried Fruit in Chna, *The Toxins*, Vol.9(200),pp.2-12.
129. Phan Văn Mạnh, Nguyễn Văn Chuyên, Nguyễn Văn Ba, Bùi Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Minh Ngọc, Dương Thế Thịnh (2024), Đặc điểm nhiễm aflatoxin B1 trong một số loại gạo, ngô, lạc, vùng tại Hà Nội năm 2022 - 2023, *Tạp chí Y học Cộng đồng*, Số 66(5), Tr.109-114.
130. Lizzie Williams, Pancham Shukla, Akbar Sheikh-Akbari and Sina Mahroughi (2025), Measuring the Level of Aflatoxin Infection in Pistachio Nuts by Applying Machine Learning Techniques to Hyperspectral Images, *The Sensors (Basel)*, Vol.25(5):p.1548. doi: 10.3390/s25051548.
131. Hayrettin ÖZER , Fatma Kaplan (2025), Determination of Aflatoxin B1 and Total Aflatoxin (B1, B2, G1, and G2) Risk in Pistachios and Dried Figs Collected from Local Markets in Şanlıurfa by High Performance

Liquid Chromatography Method, *ISPEC Journal of Agricultural Sciences* (Sep 2).

132. Yehia A-G Mahmoud, Nehal E Elkaliny, Omar A Darwish, Yara Ashraf (2025), Comprehensive review for aflatoxin detoxification with special attention to cold plasma treatment, *Mycotoxin Res*, Vol.41(2):pp.277-300
133. Hillari Bynum (2023), Hướng dẫn về aflatoxin trong hạnh nhân và quả hồ trăn, *Tài liệu dịch*, Liên minh thực phẩm an toàn Thế giới.
134. Chữ Văn Mến, Phạm Huy Hoàng, Nguyễn Văn Chuyên, Nguyễn Văn Ba và CS (2025), Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng aflatoxin B1 trong dược liệu, ngũ cốc bằng sắc ký khí lỏng hiệu năng cao, *Tạp chí Y học cộng đồng*, Số.66(8), Trang.157-163.
135. Amira A. Goda, Jianrong Shi, Jianhong Xu, Xin Liu, You Zhou, Liwen Xiao, Mona Abdel-Galil, Salah H. Salem, Eman G. Ayad, Mohamed Deabes, Ofentse Pooe, M. A. (2025), Global health and economic impacts of mycotoxins: a comprehensive review, *Environmental Sciences*, Europe volume.37, Article number:122.
136. Eleonora Di Salvo 1, Giovanni Bartolomeo 1, Rossella Vadalà 1, Rosaria Costa 1, Nicola Cicero (2025), Mycotoxins in Ready-to-Eat Foods: Regulatory Challenges and Modern Detection Methods, *The Toxics*, Vol:13(6):pp.485
137. Kailin Li, Hua Cai, Baozhang Luo, Shenggang Duan, Jingjin Yang, Nan Zhang, Yi He, Aibo Wu , Hong Liu (2025), Recent Progress of Mycotoxin in Various Food Products-Human Exposure and Health Risk Assessment, *Foods*, Vol.14(5):p.865.

PHỤ LỤC 1

Danh mục các vị thuốc bắc (n = 89)

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Mẫu thuộc thân lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
1	Bạch linh	VT.03	Thể quả nấm	<i>Poria</i>
2	Bạch thược	VT.05	Rễ	<i>Radix paeoniae lactiflorae</i>
3	Bạch truật	VT.06	Thân rễ	<i>Rhizoma atractylodis macrocephalae</i>
4	Bán hạ bắc	VT.07	Thân rễ	<i>Rhizoma pinelliae</i>
5	Cam thảo	VT.10	Rễ	<i>Radix glycyrrhizae</i>
6	Cát cánh	VT.11	Rễ	<i>Radix platycodi grandiflori</i>
7	Câu kỷ tử	VT.13	Quả	<i>Fructus lycii</i>
8	Dâm dương hoắc	VT.19	Thân, rễ, lá	<i>Herba epimedii</i>
9	Đại hoàng	VT.20	Thân rễ	<i>Rhizoma rhei</i>
10	Đại táo	VT.22	Quả	<i>Fructus ziziphi jujubae</i>
11	Đan sâm	VT.23	Rễ	<i>Radix salviae miltiorrhizae</i>
12	Đảng sâm	VT.24	Rễ	<i>Radix codonopsis</i>
13	Đào nhân	VT.25	Hạt	<i>Semen pruni</i>
14	Đinh hương	VT.28	Hoa	<i>Flos syzygii aromatici</i>
15	Đỗ trọng	VT.29	Vỏ thân	<i>Cortex eucommiae</i>
16	Độc hoạt	VT.30	Rễ	<i>Radix angelicae pubescentis</i>
17	Đương quy	VT.31	Rễ	<i>Radix angelicae sinensis</i>
18	Hạ khô thảo	VT.32	Cụm hoa	<i>Spica prunellae</i>
19	Hạnh nhân	VT.33	Hạt	<i>Semen armeniacae amarum</i>
20	Hoàng bá	VT.34	Vỏ thân	<i>Cortex phellodendri</i>
21	Hoàng đằng	VT.36	Thân và rễ	<i>Caulis et radix fibraureae</i>
22	Hoàng kỳ	VT.37	Rễ	<i>Radix astragali membranacei</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Mẫu thuộc thân lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
23	Hoàng kỳ chế	VT.38	Rễ	<i>Radix astragali membranacei</i>
24	Hoàng liên	VT.39	Thân rễ	<i>Rhizoma coptidis</i>
25	Hoắc hương	VT.40	Thân, rễ, lá	<i>Herba pogostemonis</i>
26	Hồng hoa	VT.41	Hoa	<i>Flos carthami tinctorii</i>
27	Huyền hồ	VT.42	Rễ củ	<i>Tuber corydalis</i>
28	Huyền sâm	VT.43	Rễ	<i>Radix scrophulariae</i>
29	Ích trí nhân	VT.45	Quả	<i>Fructus alpiniae oxyphyllae</i>
30	Ké đầu ngựa	VT.46	Quả	<i>Fructus xanthii strumarii</i>
31	Kim ngân hoa	VT.48	Hoa	<i>Flos lonicerae</i>
32	Kha tử	VT.50	Quả	<i>Fructus terminaliae chebulae</i>
33	Khiếm thực	VT.51	Hạt	<i>Semen euryales</i>
34	Khuong hoạt	VT.52	Thân rễ	<i>Rhizoma et radix notopterygii</i>
35	Liên kiều	VT.55	Quả	<i>Fructus forsythiae</i>
36	Long đởm thảo	VT.57	Rễ, thân rễ	<i>Radix et rhizoma gentianae</i>
37	Mạch môn	VT.58	Rễ	<i>Radix ophiopogonis japonici</i>
38	Linh chi	VT.59	Nấm	<i>Ganoderma</i>
39	Mẫu đơn bì	VT.60	Vỏ rễ	<i>Cortex paeoniae suffruticosae</i>
40	Mộc hương	VT.61	Rễ	<i>Radix saussureae lappae</i>
41	Mộc qua	VT.62	Quả	<i>Fructus chaenomelis speciosae</i>
42	Một dược	VT.64	Nhựa	<i>Myrrha</i>
43	Ngũ vị tử	VT.66	Quả	<i>Fructus schisandrae</i>
44	Ngưu bàng tử	VT.67	Quả	<i>Fructus arctii lappae</i>
45	Ngưu tất	VT.68	Rễ	<i>Radix achyranthis bidentatae</i>
46	Nhục thung dung	VT.70	Thân	<i>Herba cistanches</i>
47	Phụ tử chế	VT.74	Rễ	<i>Radix aconiti lateralis</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Mẫu thuộc thân lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
				<i>praeparata</i>
48	Phục thần	VT.75	Thể quả nấm phơi khô	<i>Poria</i>
49	Sa sâm	VT.77	Rễ	<i>Radix glehniae</i>
50	Sài hồ	VT.78	Rễ	<i>Radix bupleuri</i>
51	Sơn thù	VT.80	Quả	<i>Fructus corni officinalis</i>
52	Táo nhân	VT.82	Hạt	<i>Semen ziziphi mauritanae</i>
53	Tần giao	VT.83	Rễ	<i>Radix gentianae macrophyllae</i>
54	Tế tân	VT.84	Rễ	<i>Radix et rhizoma asari</i>
55	Tiền hồ	VT.85	Rễ	<i>Radix peucedani</i>
56	Thăng ma	VT.91	Thân rễ	<i>Rhizoma cimicifugae</i>
57	Thiên ma	VT.92	Thân rễ	<i>Rhizoma gastrodiae elatae</i>
58	Thông thảo	VT.93	Lõi thân	<i>Medulla tetrapanacis</i>
59	Thuyền thoái	VT.94	Xác ve	<i>Periostracum cicadidae</i>
60	Thương truật	VT.95	Thân rễ	<i>Rhizoma atractylodis</i>
61	Trắc bách diệp	VT.97	Lá	<i>Cacumen platycladi</i>
62	Uy linh tiên	VT.99	Rễ	<i>Radix et rhizoma clematidis</i>
63	Viễn chí	VT.100	Rễ	<i>Radix polygalae</i>
64	Xa tiền tử	VT.102	Hạt	<i>Semen plantaginis</i>
65	Xuyên khung	VT.103	Thân rễ	<i>Rhizoma ligustici wallichii</i>
66	Ý dĩ	VT.104	Hạt	<i>Semen coicis</i>
67	Đẳng tâm thảo	VT.105	Lõi thân	<i>Medulla junci effusi</i>
68	A giao	VT.109	Keo da con lừa	<i>Colla corii asini</i>
69	Xích thược	VT.114	Rễ	<i>Radix paeoniae</i>
70	Tri mẫu	VT.115	Thân rễ	<i>Rhizoma anemarrhenae</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Mẫu thuộc thân lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
71	Hà thủ ô đỏ	VT.116	Rễ	<i>Radix fallopiae multiflorae</i>
72	Phá cố chỉ	VT.117	Quả	<i>Fructus psoraleae corylifoliae</i>
73	Sinh địa	VT.129	Rễ	<i>Radix rehmanniae glutinosae</i>
74	Xa tiền diệp	VT.130	Hạt	<i>Folium plantaginis</i>
75	Kim anh	VT.132	Quả	<i>Fructus rosae laevigatae</i>
76	Tân di	VT.136	Búp	<i>Flos magnoliae liliflorae</i>
77	Thỏ ty tử	VT.138	Hạt	<i>Semen cuscutae</i>
78	Xuyên bối mẫu	VT.145	Thân hành	<i>Bulbus fritillariae</i>
79	Bạch tật lê	VT.152	Quả	<i>Fructus tribuli terrestris</i>
80	Hoàng bá	VT.154	Vỏ thân	<i>Cortex phellodendri</i>
81	Bách hợp	VT.157	Vảy	<i>Bulbus lilii</i>
82	Chi tử	VT.159	Quả	<i>Fructus gardeniae</i>
83	Thiên hoa phấn	VT.162	Rễ	<i>Radix trichosanthis</i>
84	Ngô thù du	VT.163	Quả	<i>Fructus evodiae rutaecarpae</i>
85	Địa cốt bì	VT.164	Vỏ rễ	<i>Cortex lycii chinensis</i>
86	Tam lăng	VT.167	Thân rễ	<i>Rhizoma sparganii</i>
87	Thạch斛	VT.168	Thân, rễ, lá	<i>Herba dendrobii</i>
88	Tử uyển	VT.169	Rễ	<i>Radix asteris</i>
89	Hậu phác	VT.170	Vỏ thân	<i>Cortex magnoliae officinali</i>

PHỤ LỤC 2

Danh mục các vị thuốc nam (n =81)

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Thân - lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
1	Bạc hà	VT.01	Thân, rễ, lá	<i>Herba menthae</i>
2	Bạch giới tử	VT.02	Hạt	<i>Semen simipis albae</i>
3	Bạch mao căn	VT.04	Rễ	<i>Rhizoma imperatae cylindrica</i>
4	Bình lang	VT.08	Hạt	<i>Semen arecae</i>
5	Bình vôi	VT.09	Thân củ	<i>Tuber stephaniae</i>
6	Câu đằng	VT.12	Cành có móc	<i>Ramulus cum unco uncariae</i>
7	Bạch chỉ	VT.14	Rễ	<i>Radix angelicae dahuricae</i>
8	Cỏ nhọ nồi	VT.15	Thân, rễ, lá	<i>Herba ecliptae</i>
9	Củ gai	VT.16	Rễ	<i>Radix boehmeriae niveae</i>
10	Cát căn	VT.17	Rễ	<i>Radix puerariae thomsonii</i>
11	Chỉ xác	VT.18	Quả	<i>Fructus aurantii</i>
12	Đại hồi	VT.21	Quả	<i>Fructus illicii veri</i>
13	Địa liên	VT.26	Thân rễ	<i>Rhizoma kaempferiae galangae</i>
14	Địa long	VT.27	Con	<i>Pheretima</i>
15	Hoàng cầm	VT.35	Rễ	<i>Radix scutellariae</i>
16	Hương phụ	VT.44	Thân rễ	<i>Rhizoma cyperi</i>
17	Kê nội kim	VT.47	Màng mề gà	<i>Endothelium corneum gigeriae galli</i>
18	Kim tiền thảo	VT.49	Thân, rễ, lá	<i>Herba desmodii styracifolii</i>
19	La bạc tử	VT.53	Hạt	<i>Semen raphani sativi</i>
20	Lá lốt	VT.54	Thân rễ lá	<i>Herba pperis lolot</i>
21	Liên tâm	VT.56	Nhân hạt	<i>Embryo nelumbinis nuciferae</i>
22	Mộc thông	VT.63	Thân	<i>Caulis clematidis</i>
23	Nga truat	VT.65	Thân rễ	<i>Rhizoma curcumae zedoariae</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Thân - lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
24	Nhân trần	VT.69	Thân, lá	<i>Herba adenosmatis caerulei</i>
25	Ô dược	VT.71	Rễ	<i>Radix linderæ</i>
26	Ô tặc cốt	VT.72	Mai mực	<i>Os sepiae</i>
27	Dây gấm	VT.73	Thân dây	<i>Caulis et radix gneti montani</i>
28	Khô qua	VT.76	Quả	<i>Fructus momordicae charantiae</i>
29	Sinh khương	VT.79	Thân rễ	<i>Rhizoma zingiberis recens</i>
30	Tang bạch bì	VT.81	Vỏ rễ	<i>Cortex mori albae radices</i>
31	Tô tử	VT.86	Quả	<i>Fructus perillae frutescens</i>
32	Tỳ giải	VT.87	Thân rễ	<i>Rhizoma dioscoreae</i>
33	Thạch xương bồ	VT.88	Thân rễ	<i>Rhizoma acori graminei</i>
34	Thảo quả	VT.89	Quả	<i>Fructus amomi aromatici</i>
35	Thảo quyết minh	VT.90	Hạt	<i>Semen cassiae torae</i>
36	Trạch tả	VT.96	Thân rễ	<i>Rhizoma alismatis</i>
37	Trinh nữ	VT.98	Thân, rễ, lá	<i>Herba mimosae pudicae</i>
38	Xạ can	VT.101	Rễ	<i>Rhizoma belamcandae</i>
39	Hoài sơn	VT.106	Rễ củ	<i>Tuber dioscoreae persimilis</i>
40	Lá dung	VT.107	Lá	<i>Symplocos racemosa roxb</i>
41	Thiên niên kiện	VT.108	Thân rễ	<i>Rhizoma homalomenae occultae</i>
42	Liên nhục	VT.110	Hạt	<i>Semen nelumbinis</i>
43	Chè dây	VT.111	Lá	<i>Folium ampelopsis</i>
44	Quế chi	VT.112	Vỏ cành	<i>Ramulus cinnamomi</i>
45	Ngũ gia bì	VT.113	Vỏ thân, vỏ cành	<i>Cortex schefflerae heptaphyllae</i>
46	Nhục quế	VT.118	Vỏ thân	<i>Cortex cinnamomi</i>
47	Dạ cẩm	VT.119	Thân, rễ, lá	<i>Herba hedyotidis capitellatae</i>
48	Lạc tiên	VT.120	Thân, rễ, lá	<i>Herba passiflorae</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Thân - lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
49	Sa nhân	VT.121	Quả	<i>Fructus amomi</i>
50	Thục địa	VT.122	Rễ	<i>Radix rehmanniae glutinosae praeparata</i>
51	Thỏ phục linh	VT.123	Thân rễ	<i>Rhizoma smilacis glabrae</i>
52	Giảo cổ lam	VT.124	Thân, rễ, lá	<i>Herba gynostemmae pentaphylli</i>
53	Ích mẫu	VT.125	Thân, rễ, lá	<i>Herba leonuri japonici</i>
54	Hy thiêm	VT.126	Thân, rễ, lá	<i>Herba siegesbeckiae</i>
55	Bồ công anh	VT.127	Thân, rễ, lá	<i>Herba lactucae indicae</i>
56	Kê huyết đằng	VT.128	Thân leo	<i>Caulis spatholobi</i>
57	Huyết giác	VT.131	Lõi gỗ	<i>Lignum dracaenae cambodiana</i>
58	Bạch biển đậu	VT.133	Hạt	<i>Semen lablab</i>
59	Tang ký sinh	VT.134	Thân, rễ, lá	<i>Herba loranthi gracilifolii</i>
60	Cốt khí củ	VT.135	Rễ	<i>Radix polygoni cuspidati</i>
61	Tục đoạn	VT.137	Rễ	<i>Radix dipsaci</i>
62	Diệp hạ châu	VT.139	Thân, rễ, lá	<i>Herba phyllanthi urinariae</i>
63	Mẫu lệ	VT.140	Vỏ	<i>Concha ostreae</i>
64	Dây đau xương	VT.141	Thân dây	<i>Caulis tinosporae tomentosae</i>
65	Kinh giới	VT.142	Thân, rễ, lá	<i>Herba elsholiziae ciliatae</i>
66	Trần bì	VT.143	Vỏ quả	<i>Pericarpium citri reticulatae perenne</i>
67	Cốt toái bồ	VT.144	Thân rễ	<i>Rhizoma drynariae</i>
68	Hồ hoa	VT.146	Hoa	<i>Flos styphnolobii japonici</i>
69	Cầu tích	VT.147	Thân rễ	<i>Rhizoma cibotii</i>
70	Khuông hoàng	VT.148	Thân rễ	<i>Rhizoma et radix curcumae longae</i>
71	Lá khôi	VT.149	Lá	<i>Folium ardisiae</i>

TT	Tên vị thuốc	Mã số	Thân - lá; Rễ - củ; Quả	Tên khoa học
72	Dây tơ hồng	VT.150	Thân, rễ, lá	<i>Herba cuscutae</i>
73	Ba kích	VT.151	Rễ	<i>Radix morindae officinalis</i>
74	Tô mộc	VT.153	Lõi gỗ	<i>Lignum sappan</i>
75	Sơn tra	VT.155	Quả	<i>Fructus mali</i>
76	Rau má	VT.156	Thân, rễ, lá	<i>Herba centellae asiaticae</i>
77	Mạch nha	VT.158	Quả	<i>Fructus hordei germinatus</i>
78	Khổ sâm	VT.160	Lá và cành	<i>Folium et ramulus crotonis tonkinensis</i>
79	Tang chi	VT.161	Cành	<i>Ramulus mori albae</i>
80	Cối xay	VT.165	Thân, rễ, lá	<i>Herba abutili indici</i>
81	Thạch cao	VT.166	Chất khoáng thiên nhiên	<i>Gypsum fibrosum</i>

Phụ lục 3

KẾT QUẢ XÉT NGHIỆM

XÁC ĐỊNH aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂) TRONG DƯỢC LIỆU BẰNG HPLC

I. Thông tin mẫu

1. Mẫu thử: 170 mẫu dược liệu (Phụ lục 1, Phụ lục 2)

II. Quy trình phân tích: phương pháp sắc ký lỏng (ĐĐVN V, phụ lục 5.3)

* Hóa chất, thuốc thử:

- Methanol, acetonitril, toluen, nước, pyridinium hydrobromid perbromid tinh khiết sắc ký.

* Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký RP 18: Phenomenex (25 cm × 4,6 mm x 5 μm)

- Pha động: acetonitril - methanol - nước (150: 250: 600)

- Tốc độ dòng: 1 ml/min

- Thể tích tiêm: 99 μl

- Nhiệt độ cột: 35°C

- Detector huỳnh quang bước sóng kích thích 365nm, bước sóng phát xạ 435nm

- Hai cuộn phản ứng

Reaction coil 1: 3 m (PEEK tube ID 0.33 mm x 5 m)

Reaction coil 2: 7 m (PEEK tube ID 0.5 mm x 9 m)

PEEK: Polyetherether ketone

-Thuốc thử dẫn xuất hóa sau cột: Hòa tan 50 mg pyridinium hydrobromid perbromid (TT) trong 1000 ml nước, lọc qua màng lọc 0,45μm (bảo quản tránh ánh sáng và dùng trong 4 ngày); tốc độ 0,4 ml/phút

* Chuẩn bị các dung dịch:

[Các aflatoxin đều bị ánh sáng phân hủy. Cần tiến hành định lượng trong khu vực tránh ánh sáng ban ngày bằng cách dùng lá chắn tia tử ngoại trên cửa sổ]

kết hợp với ánh sáng dịu, hoặc dùng rèm che kết hợp với chiếu sáng nhân tạo (có thể bằng đèn tuýp huỳnh quang). Bảo quản các dung dịch chứa aflatoxin tránh ánh sáng ban ngày]

- **Dung dịch chuẩn:** Từ dung dịch chuẩn hỗn hợp gốc, pha dãy 5 dung dịch chuẩn hỗn hợp có chứa aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂) với nồng độ từ 0,025 ppb – 0,5 ppb.

+ C gốc = 1 µg/ml = 1 ppm = 1000 ppb

(chuẩn Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ 1 µg/ml/acetonitrile, nguồn gốc LGC Labor GmbH, Dr Ehrenstorfer, lô 1-G1360585AL)

+ C gốc 1 = Hút chính xác 125 µl dung dịch C gốc cho vào bđm 5 ml, vừa đủ bằng acetonitrile.

Pha dãy dung dịch chuẩn:

Hút chính xác V (µl) dung dịch C gốc 1 cho vào bđm 25 ml, dùng khí N₂ cô cạn dung môi, thêm 7,5 ml methanol cho chuẩn tan hết, vừa đủ đến vạch bằng nước, lắc đều.

STT	C chuẩn (ppb)	V µl	ml
1	0,025	25	25
2	0,05	50	25
3	0,1	100	25
4	0,2	200	25
5	0,3	300	25
6	0,4	400	25

- **Dung dịch thử:** Dùng cột sắc ký ái lực miễn dịch chứa kháng thể đối với aflatoxin (B₁, B₂, G₁, G₂). Giữ cột sắc ký ái lực miễn dịch ở nhiệt độ phòng. (cột Aflatest – Mycotoxin testing system, nguồn gốc Waters VICAM)

Lấy 5,00 g dược liệu đã tán bột (qua rây số 500), thêm 100,0 ml dung dịch methanol 70%, chiết bằng siêu âm trong 30 min.

Lọc dịch chiết qua giấy lọc, bỏ 10ml dịch lọc đầu.

Hút 5,0 ml dịch lọc trong cho vào một bình nón. Thêm 35,0 ml nước, lắc đều. (từ mẫu số 7 đến mẫu 18 thay nước bằng dung dịch tween 20 nồng độ 2% để loại tạp màu)

Cho dung dịch này chảy qua cột sắc ký ái lực miễn dịch với tốc độ khoảng 3 ml/min (không vượt quá 5 ml/min), nếu cột không chảy được thì dùng hút chân không áp suất phù hợp để dịch chảy từ từ.

Rửa cột bằng nước 2 lần, mỗi lần 10 ml với tốc độ không quá 5 ml/min rồi làm khô bằng cách áp một chân không nhẹ trong 5 đến 10 s, hoặc bằng cách dùng bơm tiêm thổi không khí qua cột sắc ký trong 10 s.

Cho 0,5 ml methanol (TT) lên cột và để chảy qua cột nhờ trọng lực.

Thu dịch rửa giải vào một bình định mức cỡ 5 ml. Sau 1 min, lại cho tiếp 0,5 ml methanol (TT) và hứng lấy dịch rửa giải lần 2.

Chờ 1 min sau lại thực hiện lần rửa giải thứ 3 nữa cũng với 0,5 ml methanol (TT). Thu tối đa dịch rửa giải bằng cách nén không khí hoặc tạo một chân không nhẹ qua cột.

Thêm nước vào bình định mức vừa đủ 5 ml, lắc đều.

Nếu thu được dung dịch trong thì có thể dùng ngay để phân tích. Nếu dung dịch không trong suốt thì cần lọc trước khi tiêm sắc ký. Dùng màng lọc sẵn dùng 1 lần (màng lọc polytetrafluoroethylen cỡ lỗ lọc 0,45 μ m) đã được chứng minh là không gây mất aflatoxin do lưu giữ.

- Mẫu thử thêm chuẩn (spike):

Tiến hành như mẫu thử: Lấy 5,00 g dược liệu đã tán bột (qua rây số 500), lần lượt thêm chính xác 0,5 ml dung dịch C gốc 1, 100,0 ml dung dịch methanol 70%, chiết bằng siêu âm trong 30 min.

Tiến hành tương tự như dung dịch thử.

* Tính kết quả

- Thiết lập phương trình đường chuẩn $y = ax + b$ với nồng độ aflatoxin B₁/B₂/G₁/G₂ (ng/ml) trên trục x và tín hiệu đáp ứng (S) trên trục y.
- Nồng độ aflatoxin B₁/B₂/G₁/G₂ (C) trong dung dịch đo được tính bằng biểu thức:

$$C \text{ (ng/ml)} = \frac{S - b}{a}$$

- Tính hàm lượng aflatoxin B₁/B₂/G₁/G₂ trong dược liệu, biểu thị bằng ng/g, theo công thức sau:

$$X \text{ (ng/g)} = \frac{100 \times C}{m}$$

Trong đó:

- m là khối lượng dược liệu lấy để phân tích (g).
- C là nồng độ aflatoxin đo được từ dung dịch thử (ng/ml)

III. Kết quả xét nghiệm aflatoxin ở các vị thuốc đông dược không nhiễm nấm

TT	Tên vị thuốc	Định lượng loại aflatoxin nhiễm (ng/g)			
I. Các vị thuốc nhiễm nấm mốc		G2	G1	B2	B1
1	Bạch giới tử	0	0	0	0
2	Bạch mao căn	0	0	0	0
3	Bạch thược	0	0	0	0
4	Bán hạ	0	0	0	0
5	Bình lang	0	0	0	0
6	Cam thảo	0	0	0	0
7	Cát cánh	0	0	0	0
8	Củ gai	0	0	0	0
9	Chỉ xác	0	0	0	0
10	Đại táo	0	0	0	0
11	Đảng sâm	0	0	0	0
12	Địa long	0	0	0.0729	0
13	Đinh hương	0	0	0.0243	0
14	Đỗ trọng	0	0	1.3666	0
15	Độc hoạt	0	5.4588	2.7686	0
16	Đương quy	0	0	0	0
17	Hạnh nhân	0	0	0	0
18	Hoàng kỳ	0	0	0	0
19	Hoắc hương	0	0	0	0
20	Hồng hoa	0	0	0	0
21	Huyền sâm	0	0	0	0
22	Kha tử	0	0	0	0
23	Liên tâm	0	0	0	0
24	Mẫu đơn bì	0	2.0501	0	0

25	Mộc thông	0	0	0	0
26	Mộc dược	0	0	0.2420	2.4646
27	Ngưu bàng tử	0	0	0	0
28	Ngưu tất	0	0	0	0
29	Nhân trần	0	0	0	0
30	Ô tặc cốt	0	0	0	0
31	Phục thần	0	0	0	0
32	Sa sâm	0	0	0	0
33	Tang bì	0	0	0	0
34	Tần giao	0	0	0	0
35	Tiền hồ	0	2.2170	0	0
36	Tỳ giải	0	0	0	0
37	Thạch xương bồ	0.3164	1.0756	0.1389	0
38	Thông thảo	0	0	0	0
39	Thuyền thoái	0	0	0	0
40	Thương truật	0	0	0	0
41	Trinh nữ	0	0	0	0
42	Xạ cam	0	0	0	0
43	Xa tiền tử	0	0	0.1255	0
44	Nấm linh chi	0	0	0	0
45	Đảng sâm	0	0	0.0594	0
46	Hoài sơn	0	0	0	0
47	Lá dung	0	0	0	0
48	Liên nhục	0	0	0	0
49	Ngũ gia bì	0	0	0	0
50	Xích thược	0	0	0	0
51	Tang ký sinh	0	0	0	0

52	Tân di	0	0	0.0657	0
53	Chi tử	0	0.9266	0.1191	1.6933
54	Thiên hoa phấn	0	0	0.0595	0
55	Thạch mộc	0	0	0	0

II. Các vị thuốc không nhiễm nấm (6/115)

TT	Tên vị thuốc	Định lượng loại aflatoxin nhiễm (ng/g)			
		G2	G1	B2	B1
1	Đại táo	0	0	0	2.4145
2	Đan sâm	0	0	2.4641	0
3	Địa long	0.3164	0	0	0
4	Đinh hương	0.2487	0	0	0
5	Đỗ trọng	0	0.5429	0	0
6	Đương quy	0	0	0	2.9646

Ghi chú: Tham khảo AOAC với mức nồng độ spike thêm vào mẫu, % tìm lại nên nằm trong khoảng 50-120%