

**Tối ưu quy trình PCR đa môi phát hiện một số gen kháng carbapenem  
ở *Klebsiella pneumoniae***

**Ngô Thị Minh Hà<sup>1,2</sup>, Đinh Thị Thu Hằng<sup>1,3\*</sup>, Vũ Tuấn Anh<sup>1,4</sup>, Trần Anh Tuấn<sup>1,5</sup>,  
Hoàng Xuân Sứ<sup>1,3</sup>, Hoàng Xuân Quảng<sup>1</sup>, Lê Thu Hồng<sup>1,6</sup>, Nguyễn Văn An<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Bộ môn - Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y,  
261 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Xét nghiệm - Giải phẫu bệnh lý, Viện Y học Cổ truyền Quân đội,  
442 Kim Giang, phường Định Công, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Phòng Vi sinh và các mầm bệnh sinh học, Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự,  
Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Ngân hàng Mô và Tế bào, Bệnh viện Bổng Quốc gia Lê Hữu Trác, Học viện Quân y,  
263 Phùng Hưng, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

<sup>5</sup>Khoa Xét nghiệm - Giải phẫu bệnh lý, Bệnh viện Quân y 211,  
410 Phạm Văn Đồng, phường Thống Nhất, tỉnh Gia Lai, Việt Nam

<sup>6</sup>Khoa Xét nghiệm, Bệnh viện Đa khoa 16A Hà Đông,  
150 Nguyễn Sơn Hà, phường Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 20/5/2026; ngày chuyển phản biện 22/5/2026;

ngày nhận phản biện 9/6/2026; ngày chấp nhận đăng 19/6/2026

**Tóm tắt:**

*Enterobacterales* kháng carbapenem được Tổ chức Y tế Thế giới xếp vào nhóm tác nhân vi khuẩn nguy hiểm nhất đối với sức khỏe cộng đồng, trong đó có *Klebsiella pneumoniae*. Nghiên cứu này nhằm thiết kế và tối ưu hai phản ứng PCR đa môi (mPCR) phát hiện đồng thời 5 gen kháng carbapenem ở *K. pneumoniae* là *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> và *bla*<sub>OXA-48-like</sub> gồm mPCR1 và mPCR2. Sử dụng DNA được tách từ khuẩn lạc bằng phương pháp sốc nhiệt với chứng dương gồm các chủng vi khuẩn và plasmid mang gen đích đã được khẳng định bằng giải trình tự để thiết kế và tối ưu mPCR. Kết quả đã tối ưu thành công mPCR1 (Ta 54°C, nồng độ môi *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> lần lượt là 0,4; 0,2; 0,3 µM) và mPCR2 (Ta 58°C, nồng độ môi *bla*<sub>NDM</sub> 0,5 µM, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> 0,3 µM). Thử nghiệm mPCR tối ưu trên 30 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng tại Bệnh viện Quân y 103 ghi nhận 26,7% (8/30) chủng mang gen mã hóa carbapenemase, chủ yếu là các chủng mang đơn gen chiếm 75,0% (6/8); các chủng mang tổ hợp 2 gen chiếm 25,0% (2/8); không phát hiện được chủng mang gen *bla*<sub>IMP</sub> và *bla*<sub>VIM</sub>. Quy trình mPCR

\*Tác giả liên hệ: Email: hangdinhhbio@gmail.com, ank59hvqy@gmail.com

được tối ưu là cơ sở sàng lọc nhanh một số gen mã hóa carbapenemase của *K. pneumoniae* trên mẫu lâm sàng, góp phần hỗ trợ lựa chọn điều trị và kiểm soát nhiễm khuẩn.

**Từ khoá:** carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, PCR đa môi.

**Chỉ số phân loại:** 3.1, 3.2

**Optimisation of a multiplex PCR assay for the detection of carbapenem resistance genes in *Klebsiella pneumoniae***

**Thi Minh Ha Ngo<sup>1,2</sup>, Thi Thu Hang Dinh<sup>1,3\*</sup>, Tuan Anh Vu<sup>1,4</sup>, Anh Tuan Tran<sup>1,5</sup>, Xuan Su Hoang<sup>1,3</sup>, Xuan Quang Hoang<sup>1</sup>, Thu Hong Le<sup>1,6</sup>, Van An Nguyen<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Military Hospital 103, Vietnam Military Medical Academy, 261 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine and Pathology, Military Institute of Traditional Medicine, 442 Kim Giang Street, Dinh Cong Ward, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Pathogens, Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical Academy, 222 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>Cells and Tissue Bank, Le Huu Trac National Burn Hospital, Vietnam Military Medical Academy, 263 Phung Hung Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

<sup>5</sup>Department of Laboratory Medicine and Pathology, Military Hospital 211, 410 Pham Van Dong Street, Thong Nhat Ward, Gia Lai Province, Vietnam

<sup>6</sup>Department of Laboratory Medicine, 16A Ha Dong General Hospital, 150 Nguyen Son Ha Street, Ha Dong Ward, Hanoi, Vietnam

Received 20 May 2026; revised 9 June 2026; accepted 19 June 2026

**Abstract:**

Carbapenem-resistant *Enterobacterales* have been classified by the World Health Organisation as one of the most critical bacterial threats to public health, including *Klebsiella pneumoniae*. This study aimed to design and optimise two multiplex PCR assays for the simultaneous detection of five carbapenem resistance genes in *K. pneumoniae*, including mPCR1 (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>) and mPCR2 (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>). DNA extracted from bacterial colonies using the heat-shock method was used, while positive controls consisted of bacterial strains and plasmids carrying the target genes confirmed by DNA sequencing. The optimised conditions were successfully established for mPCR1, with an annealing temperature of 54°C and primer concentrations of 0.4, 0.2, and 0.3 µM for *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, respectively; and for mPCR2, with an annealing temperature of 58°C and primer concentrations of 0.5 µM for *bla*<sub>NDM</sub> and 0.3 µM for *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Evaluation of the optimised assays on 30 clinical *K. pneumoniae*

isolates from Military Hospital 103 showed that 26.7% (8/30) harbored carbapenemase genes, predominantly single-gene carriers (75.0%, 6/8), while 25.0% (2/8) carried two carbapenemase genes. No isolates carrying *bla<sub>IMP</sub>* or *bla<sub>VIM</sub>* were detected. The optimised mPCR protocol provides a rapid tool for screening of selected carbapenemase-encoding genes in clinical *K. pneumoniae* isolates, thereby supporting treatment selection and infection control.

**Keywords:** carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, multiplex PCR.

**Classification numbers:** 3.1, 3.2

## 1. Đặt vấn đề

Kháng kháng sinh, đặc biệt là kháng carbapenem, đang trở thành một trong những thách thức nghiêm trọng đối với nền y tế trong nước và quốc tế, nhất là trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn Gram âm đa kháng. Tổ chức Y tế Thế giới năm 2024 đã xếp *Enterobacterales* kháng carbapenem (Carbapenem-resistant *Enterobacterales*, CRE) vào nhóm tác nhân gây cực kỳ nguy hiểm do gây ra tỷ lệ tử vong rất cao và còn ít kháng sinh hiệu quả để điều trị [1]. Trong đó, *Klebsiella pneumoniae* nổi bật với khả năng gây bệnh đa dạng như viêm phổi, nhiễm khuẩn huyết, nhiễm trùng tiết niệu [2, 3]. Cơ chế kháng carbapenem của *K. pneumoniae* chủ yếu liên quan đến sự xuất hiện của các gen mã hóa carbapenemase, đặc biệt là các nhóm gen *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>* [4].

Trong chẩn đoán vi sinh lâm sàng, việc xác định kiểu hình kháng carbapenem là rất cần thiết. Bên cạnh đó, phát hiện nhanh, chính xác và đồng thời các gen mã hóa carbapenemase bằng các kỹ thuật sinh học phân tử có ý nghĩa quan trọng trong định hướng điều trị sớm, kiểm soát nhiễm khuẩn bệnh viện và giám sát dịch tễ học vi khuẩn kháng kháng sinh. So với kỹ thuật PCR đơn môi (singleplex PCR), PCR đa môi (multiplex PCR, mPCR) cho phép phát hiện đồng thời nhiều gen đích trong một ống phản ứng, giúp tiết kiệm thời gian, hóa chất và chi phí. Tuy nhiên, việc thiết lập mPCR với nhiều cặp môi đòi hỏi quá trình tối ưu hóa chặt chẽ do sự khác biệt về nhiệt độ nóng chảy ( $T_m$ ), kích thước sản phẩm PCR và hiện tượng cạnh tranh khuếch đại giữa các cặp môi. Điều này được đề cập đến trong nghiên cứu của E.M. Elnifro và cs (2000) [5], phản ứng mPCR nếu không được tối ưu, có thể xuất hiện khuếch đại ưu tiên chỉ một số gen đích hoặc không đặc hiệu, làm giảm độ nhạy và độ đặc hiệu của xét nghiệm. Đồng thời, nghiên cứu của A. Noweiska và cs (2023) [6] cũng cho thấy, thiết kế mPCR đòi hỏi tối ưu nghiêm ngặt dựa trên ba nguyên tắc chính: lựa chọn các cặp môi, xác định nhiệt độ gắn môi, điều chỉnh thành phần hỗn hợp PCR, để đảm bảo cân bằng tín hiệu trong phản ứng.

Tương tự, T.T. Le và cs (2024) [7] khi phát triển multiplex real-time PCR phát hiện đồng thời *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>* và *mcr-1* ghi nhận cần điều chỉnh nồng độ từng cặp môi, bổ sung DMSO/glycerol và thiết lập khoảng  $T_m$  phù hợp để bảo đảm khả năng phân

biệt các gen đích. Điều này cho thấy tối ưu hóa thiết kế môi và điều kiện phản ứng là yêu cầu quan trọng nhằm nâng cao độ đặc hiệu, độ nhạy và tính ổn định của mPCR trong phát hiện các gen mã hóa carbapenemase. Nhìn chung, mPCR có ưu điểm là phát hiện đồng thời nhiều gen đích, tiết kiệm thời gian và chi phí, tuy nhiên đòi hỏi quá trình tối ưu hóa trước khi áp dụng thường quy tại mỗi cơ sở y tế [7, 8]. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm thiết kế và tối ưu phản ứng mPCR phát hiện đồng thời 5 gen kháng carbapenem chủ yếu ở *K. pneumoniae*, bao gồm *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* và đánh giá thử nghiệm trên các chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng tại Bệnh viện Quân y 103. Điểm khác biệt của nghiên cứu là xây dựng quy trình phù hợp với điều kiện thực hành trong nước, sử dụng phương pháp tách DNA đơn giản thay cho kit thương mại và thiết kế mPCR xác định 5 gen đích thành hai phản ứng mPCR riêng biệt nhằm hạn chế tương tác giữa các cặp môi và tăng tính ổn định. Nghiên cứu này góp phần tạo cơ sở xây dựng một quy trình xét nghiệm khả thi, chi phí hợp lý và có tiềm năng hỗ trợ phát hiện nhanh các gen mã hóa carbapenemase ở *K. pneumoniae* trong thực hành vi sinh lâm sàng.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng

Chúng dương là các chủng vi khuẩn mang gen đích *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>* và plasmid mang gen *bla<sub>VIM</sub>* đã được khẳng định bằng giải trình tự Sanger. Các chủng vi khuẩn có kết quả test nhanh dương tính (NG-Test CARBA 5, NG Biotech, Pháp) với các gen mã hóa carbapenemase *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>*: *Acinetobacter baumannii*: *Aba23-52bl* (mang gen *bla<sub>IMP</sub>*+*bla<sub>NDM</sub>*), *K. pneumoniae*: *Kpn23-95ur* (*bla<sub>KPC</sub>*+*bla<sub>OXA-48-like</sub>*), *K. pneumoniae*: *Kpn23-129bl* (*bla<sub>NDM</sub>*+*bla<sub>OXA-48-like</sub>*) được ký hiệu lần lượt là A52, K95, K129 lưu giữ tại Bệnh viện Quân y 103 và plasmid mang gen *bla<sub>VIM</sub>* được cung cấp từ Bệnh viện Nhiệt đới Trung ương. Trong số các chủng *K. pneumoniae* phân lập từ người bệnh tại Bệnh viện Quân y 103 năm 2025, lựa chọn ngẫu nhiên 30 chủng để đánh giá phản ứng mPCR trên mẫu lâm sàng.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Tách chiết DNA

Lấy 3-5 khuẩn lạc *K. pneumoniae* được nuôi cấy trên thạch ChromoGel Urine Agar (Alphachem, Việt Nam), nghiền đều trong 100 µl nước cất tạo huyền dịch. Đun huyền dịch ở 95°C trong 10 phút, giữ ngay huyền dịch ở điều kiện -80°C/15 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút và thu dịch nổi, lưu giữ ở điều kiện -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo [4].

#### 2.2.2. Thiết kế phản ứng mPCR

Phản ứng mPCR được thiết kế dựa trên PCR tiêu chuẩn, bao gồm mPCR1 (phát hiện 3 gen *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*) và mPCR2 (phát hiện 2 gen *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>*) để xác định chính xác, đồng thời các gen sinh carbapenemase *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>*. Việc phân nhóm các gen vào từng phản ứng được thực hiện dựa trên sự tương thích về

hiệt độ nóng chảy của môi và khả năng phân biệt kích thước sản phẩm khuếch đại trên gel điện di nhằm bảo đảm các sản phẩm khuếch đại có thể được nhận diện rõ ràng. Do cặp môi  $bla_{NDM}$  có  $T_m$  cao hơn các cặp môi khác, gen này được bố trí trong phản ứng mPCR2 nhằm hạn chế tương tác giữa các môi. Thực hiện lần lượt từ PCR đơn cho từng gen đích đến mPCR. Thông tin các cặp môi mPCR và chứng dương trong nghiên cứu được trình bày trong bảng 1 và bảng 2.

**Bảng 1. Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu.**

| Gen đích            | Trình tự môi                     | Nhiệt độ nóng chảy môi ( $T_m$ ) | Kích thước (bp) | Tài liệu tham khảo |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------|
| $bla_{KPC}$         | F: 5'-TGTCAGTGTATCGCCGTC-3'      | 56,1                             | 1011            | [9]                |
|                     | R: 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'   | 59,4                             |                 |                    |
| $bla_{NDM}$         | F: 5'-GCAGCTTGTCTCGCCATGCGGGC-3' | 71,4                             | 782             | [4]                |
|                     | R: 5'-GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT-3' | 70,0                             |                 |                    |
| $bla_{OXA-48-like}$ | F: 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3'    | 58,4                             | 438             | [10]               |
|                     | R: 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'    | 58,4                             |                 |                    |
| $bla_{VIM}$         | F: 5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3'    | 58,4                             | 382             | [11]               |
|                     | R: 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'    | 60,5                             |                 |                    |
| $bla_{IMP}$         | F: 5'-GAAGGCGTTTATTGTTTCATAC-3'  | 55,5                             | 587             | [11]               |
|                     | R: 5'-GTACGTTTCAAGAGTGATGC-3'    | 56,4                             |                 |                    |

**Bảng 2. Nồng độ DNA chứng dương mang các gen mã hóa carbapenemase.**

| Chủng chứng dương | Gen                 | Nồng độ DNA (copy/ml) |
|-------------------|---------------------|-----------------------|
| Aba23-52bl        | $bla_{NDM}$         | $6,05 \times 10^{10}$ |
|                   | $bla_{IMP}$         |                       |
| Kpn23-95ur        | $bla_{KPC}$         | $2,88 \times 10^{10}$ |
|                   | $bla_{OXA-48-like}$ |                       |
| Kpn23-129bl       | $bla_{NDM}$         | $1,99 \times 10^{10}$ |
|                   | $bla_{OXA-48-like}$ |                       |
| Plasmid VIM       | $bla_{VIM}$         | $1,00 \times 10^7$    |

### 2.2.3. Tối ưu phản ứng mPCR

Tối ưu thành phần DNA chứng dương chứa đồng thời 5 gen  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{NDM}$  và  $bla_{OXA-48-like}$  bằng cách phối trộn các chủng A52, K95, K129 và plasmid VIM với

tỷ lệ phù hợp, đảm bảo hình ảnh điện di với các gen đích sáng rõ, đồng đều, đúng kích thước lý thuyết.

Tối ưu nồng độ mỗi lần lượt cho PCR đơn, mPCR1 và mPCR2 với nồng độ cơ bản 0,3  $\mu\text{M}$  mỗi môi. Với mPCR1, cố định nồng độ mỗi của 2 gen, chạy dải nồng độ mỗi từ 0,2 đến 0,5  $\mu\text{M}$  của gen còn lại, chọn nồng độ mỗi thích hợp nhất; lần lượt chạy lặp lại quá trình đó với 2 gen còn lại để xác định nồng độ mỗi tối ưu. Tiến hành tối ưu nồng độ các môi *bla*<sub>NDM</sub> và *bla*<sub>OXA-48-like</sub> tương tự với mPCR2. Tối ưu nhiệt độ gắn mỗi (Temperature annealing, *T<sub>a</sub>*) từ 54 đến 58°C với mPCR1 và mPCR2. Chu trình khuếch đại như sau: 95°C/15 phút, (95°C/20 giây, 54-58°C/40 giây, 72°C/50 giây)<sub>x35</sub>, 72°C/5 phút. Phản ứng mPCR được tối ưu hoá sử dụng sinh phẩm 2X H-Star Taq PCR Master Mix 2 (Biofact, Hàn Quốc) với 10  $\mu\text{l}$  Master Mix, 2  $\mu\text{l}$  khuôn mẫu DNA, nồng độ mỗi các loại, bổ sung nước sinh học phân tử vừa đủ thể tích 20  $\mu\text{l}$ .

#### 2.2.4. Đánh giá mPCR tối ưu

Các phản ứng mPCR1 và mPCR2 sau thiết lập được đánh giá ngưỡng phát hiện (Limit of detection, LOD) trên panel DNA chứng dương pha loãng 10 lần. LOD được xác định là nồng độ DNA thấp nhất còn cho băng khuếch đại đặc hiệu quan sát được trên gel điện di. Đồng thời, mPCR tối ưu được đánh giá trên 30 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng để xác định kiểu gen mã hóa carbapenemase.

Các thí nghiệm được thực hiện trên hệ thống máy Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR. Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,2%, nhuộm bằng Ecodye™ Nucleic Acid, kiểm tra dưới đèn UV (BioDoc-It System, Mỹ). Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện lặp lại ít nhất hai lần để đảm bảo độ chính xác.

#### 2.2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, quản lý, lưu trữ bằng Microsoft Office 365; được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS 27.0.

#### 2.2.6. Đạo đức trong nghiên cứu

Đây là nghiên cứu trong phòng xét nghiệm, không can thiệp vào quá trình điều trị, không ảnh hưởng đến kết quả điều trị và tâm lý người bệnh. Bệnh phẩm và số liệu thu được chỉ sử dụng vào mục đích nghiên cứu khoa học. Nghiên cứu được chấp thuận bởi Hội đồng đạo đức cơ sở của Bệnh viện Quân y 103 (Số quyết định: 3470/HĐĐĐ năm 2025).

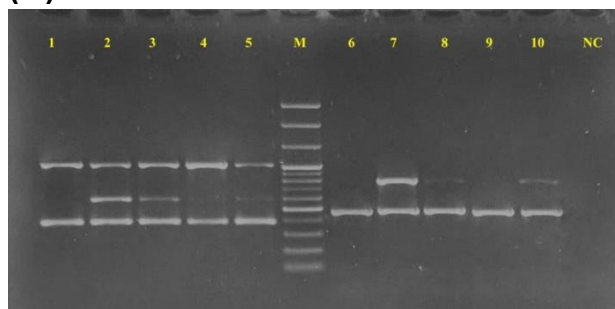
### 3. Kết quả

#### 3.1. Thiết kế và tối ưu mPCR phát hiện các gen kháng carbapenem

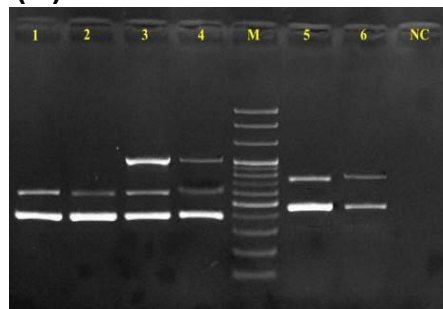
##### 3.1.1. Tối ưu thành phần DNA chứng dương, nồng độ mỗi

Tối ưu thành phần DNA chứng dương trong mPCR bằng cách phối trộn DNA chủng A52, K95, K129 và plasmid VIM với các tỷ lệ khác nhau dựa trên nồng độ ban đầu (bảng 2). Kết quả được minh họa ở hình 1.

(A)



(B)



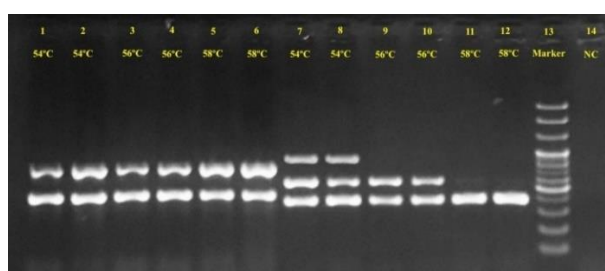
**Hình 1. Tối ưu thành phần DNA chứng dương và nồng độ môi.** (A) Tối ưu thành phần DNA chứng dương. mPCR1: 1, 2, 3, 4, 5; mPCR2: 6, 7, 8, 9, 10; 1, 6: A52 nồng độ  $10^8$  copy/ml, K95  $10^{10}$ , K129  $10^8$ , Plasmid VIM  $10^5$ ; 2, 7: A52  $10^8$ , K95  $10^9$ , K129  $10^8$ , Plasmid VIM  $10^5$ ; 3, 8: A52  $10^{10}$ , K95  $10^{10}$ , K129  $10^8$ , Plasmid VIM  $10^5$ ; 4, 9: A52  $10^9$ , K95  $10^{10}$ , K129  $10^8$ , Plasmid VIM  $10^5$ ; 5, 10: A52  $10^9$ , K95  $10^9$ , K129  $10^8$ , Plasmid VIM  $10^5$ ; (B) Tối ưu nồng độ môi cho phản ứng mPCR. 1-4: nồng độ môi KPC 0,2-0,3-0,4-0,5  $\mu$ M, IMP 0,2  $\mu$ M, VIM 0,3  $\mu$ M. 5-6: nồng độ môi NDM 0,5-0,4  $\mu$ M; OXA-48-like 0,3  $\mu$ M. NC: chứng âm. M: Marker (Thang DNA 100 bp, Biofact, Hàn Quốc).

Kết quả cho thấy, cả hai phản ứng mPCR đều xuất hiện các băng đặc hiệu đúng kích thước thiết kế khi phối trộn DNA với tỷ lệ phù hợp. Cụ thể, chủng A52 cho tín hiệu ổn định trong khoảng nồng độ từ  $10^8$  đến  $10^{10}$  copy/ml; chủng K95 cho tín hiệu nhất quán trong khoảng  $10^9$ - $10^{10}$  copy/ml; chủng K129 cho tín hiệu đạt yêu cầu ở mức  $10^8$  copy/ml; trong khi plasmid VIM cho băng đặc hiệu ở ngưỡng  $10^5$  copy/ml. Trên cơ sở đó, nhóm tác giả lựa chọn tỷ lệ phối trộn DNA chứng dương tối ưu cho các phản ứng tiếp theo với A52 là  $10^8$ , K129  $10^8$ , K95  $10^9$ , plasmid VIM  $10^5$  copy/ml (hình 1A).

Khi khảo sát nồng độ các cặp môi trong phản ứng mPCR1, ghi nhận 3 băng đặc hiệu và không có băng phụ khi nồng độ môi của *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> tương ứng là 0,4; 0,2; 0,3  $\mu$ M. Trong khi đó, mPCR2 cho tín hiệu 2 băng rõ nét khi nồng độ môi *bla*<sub>NDM</sub> là 0,5  $\mu$ M và *bla*<sub>OXA-48-like</sub> là 0,3  $\mu$ M (hình 1B). Đây là các nồng độ được lựa chọn trong mPCR1 và mPCR2 để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

### 3.1.2. Tối ưu nhiệt độ gắn môi

Nhiệt độ gắn môi của mPCR1 và mPCR2 được khảo sát ở ba mức 54, 56, 58°C, kết quả được thể hiện ở hình 2.

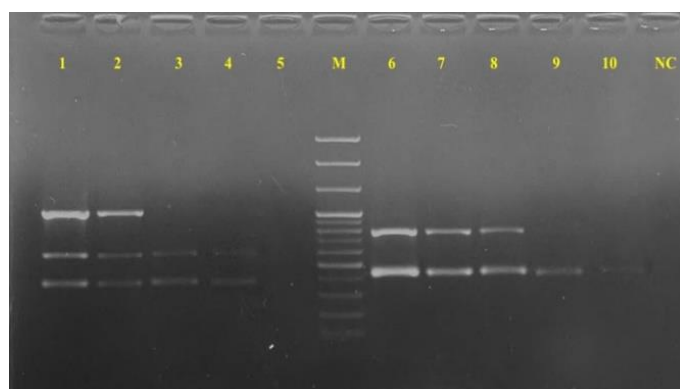


**Hình 2. Tối ưu nhiệt độ gắn môi cho phản ứng mPCR.** 1-6 là mPCR2, trong đó giếng 1-2: 54°C, giếng 3-4: 56°C, giếng 5-6: 58°C; 7-12 là mPCR1, trong đó giếng 7-8: 54°C, giếng 9-10: 56°C, giếng 11-12: 58°C. NC: chứng âm. Marker: thang DNA 100bp (Biofact, Hàn Quốc).

Với mPCR, khảo sát gradient nhiệt độ gắn môi cho thấy, hiệu quả khuếch đại giảm dần khi tăng nhiệt độ. Ở ngưỡng 54°C, phản ứng mPCR1 có đầy đủ 3 băng đặc hiệu theo đúng thiết kế với kích thước các gen *bla<sub>KPC</sub>* ~ 1000 bp, *bla<sub>IMP</sub>* ~ 600 bp và *bla<sub>VIM</sub>* ~ 400 bp; trong khi ở 56°C chỉ cho tín hiệu 2 băng tương ứng với *bla<sub>IMP</sub>* và *bla<sub>VIM</sub>*; ở 58°C chỉ xuất hiện 1 băng đúng thiết kế *bla<sub>VIM</sub>*, băng *bla<sub>IMP</sub>* cường độ sáng yếu, khó quan sát. Do đó, 54°C được lựa chọn là nhiệt độ gắn môi tối ưu cho phản ứng mPCR1. Trong khi đó, ở mPCR2, ba mức nhiệt độ 54, 56, 58°C đều có tín hiệu ổn định, tuy nhiên với nhiệt độ gắn môi 58°C cho 2 băng sáng rõ nhất, đây là điều kiện tối ưu được xác định cho mPCR2 (hình 2).

### 3.1.3. Khảo sát giới hạn phát hiện của mPCR

Sau khi tối ưu thành công mPCR xác định các gen mã hóa carbapenemase, giới hạn phát hiện của mPCR được khảo sát trên panel DNA chứng dương pha loãng 10 lần, kết quả được thể hiện ở hình 3.



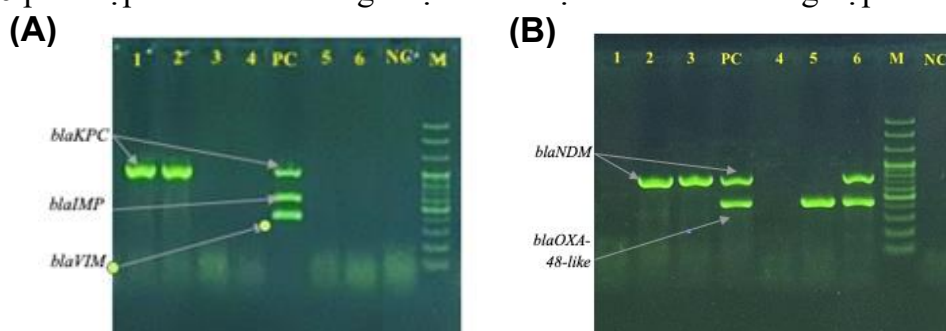
**Hình 3. Giới hạn phát hiện của mPCR.** 2-5, 7-10 là mẫu pha loãng 10 lần của 1 và 6 (1, 6 gồm *bla<sub>KPC</sub>* 10<sup>10</sup> copy/ml, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 10<sup>9</sup> copy/ml, *bla<sub>VIM</sub>* 10<sup>6</sup> copy/ml), NC: chứng âm, M: marker (Thang DNA 100 bp, Biofact, Hàn Quốc).

Giới hạn phát hiện của mPCR1 và mPCR2 được xác định trên panel độ nhạy phân tích từ 10<sup>10</sup> đến 10<sup>6</sup> copy/ml DNA tổng số đối với *bla<sub>KPC</sub>*, từ 10<sup>9</sup> đến 10<sup>5</sup> copy/ml đối với *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, từ 10<sup>6</sup> đến 10<sup>2</sup> copy/ml với plasmid *VIM*. Kết quả xác nhận giới hạn phát hiện đối với *bla<sub>KPC</sub>* là 10<sup>9</sup> copy/ml, *bla<sub>IMP</sub>* là 10<sup>6</sup> copy/ml, *bla<sub>NDM</sub>* là 10<sup>7</sup> copy/ml, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* là 10<sup>5</sup> copy/ml, *bla<sub>VIM</sub>* là 10<sup>3</sup> copy/ml (hình 3).

Như vậy, trên cơ sở khảo sát các thông số riêng lẻ, điều kiện tối ưu cho mPCR xác định các gen mã hóa carbapenemase như sau: mPCR1 với thành phần phản ứng gồm 1X H-Star Taq PCR Master Mix 2 (Biofact, Hàn Quốc); 0,4, 0,2, 0,3 µM lần lượt cho các cặp môi KPC, IMP, VIM; DNA khuôn 2 µl; bổ sung nước sinh học phân tử vừa đủ thể tích 20 µl. Chu trình khuếch đại mPCR1: 95°C/15 phút, (95°C/20 giây, 54°C/40 giây, 72°C/50 giây)<sub>x35</sub>, 72°C/5 phút. Với mPCR2 có thành phần tương tự mPCR1 trong phản ứng tổng thể tích 20 µl, khác biệt ở nồng độ môi *NDM* và *OXA-48-like* lần lượt là 0,5 và 0,3 µM. Chu trình khuếch đại mPCR2: 95°C/15 phút, (95°C/20 giây, 58°C/40 giây, 72°C/50 giây)<sub>x35</sub>, 72°C/5 phút.

### 3.2. Kết quả mPCR phát hiện các gen mã hóa carbapenemase trên mẫu lâm sàng

Kết quả xác định các gen mã hóa carbapenemase của mPCR sau khi tối ưu trên 30 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng được minh họa ở hình 4 và tổng hợp ở bảng 3.



**Hình 4. Hình ảnh điện di phát hiện các gen mã hóa carbapenemase trên mẫu lâm sàng (A) mPCR1, (B) mPCR2.** 1-6 mẫu chủng *K. pneumoniae*, mẫu 1 dương tính với gen *bla<sub>KPC</sub>*, mẫu 2 dương tính với hai gen *bla<sub>KPC</sub> + NDM*, mẫu 3 và 5 dương tính với 1 gen *bla<sub>NDM</sub>*, mẫu 6 dương tính với 2 gen *bla<sub>NDM</sub> + OXA-48-like*, mẫu 4 âm tính với cả năm gen đích. PC: chứng dương. NC: chứng âm, M: Marker (Thang DNA 100 bp, Biofact, Hàn Quốc).

**Bảng 3. Tỷ lệ kiểu gen mã hoá carbapenemase (n=30).**

| Kiểu gen mã hoá carbapenemase          | Số chủng (n/N) | Tỷ lệ (%) |
|----------------------------------------|----------------|-----------|
| <i>bla<sub>KPC</sub></i>               | 3/8            | 37,5      |
| <i>bla<sub>NDM</sub></i>               | 2/8            | 25,0      |
| <i>bla<sub>OXA-48-like</sub></i>       | 1/8            | 12,5      |
| <i>bla<sub>KPC</sub> + NDM</i>         | 1/8            | 12,5      |
| <i>bla<sub>NDM</sub> + OXA-48-like</i> | 1/8            | 12,5      |
| Chủng mang gen đích                    | 8/30           | 26,7      |
| Đơn gen                                | 6/8            | 75,0      |
| Tổ hợp 2 gen                           | 2/8            | 25,0      |
| Chủng không mang gen đích              | 22/30          | 73,3      |

Trong số 30 chủng *K. pneumoniae* được đánh giá thử nghiệm, nhóm không mang gen đích chiếm tỷ lệ cao nhất với 73,3% (22/30); trong 8 chủng (26,7%) mang gen mã hóa carbapenemase, các chủng đơn gen chiếm 75,0% (6/8) gồm *bla<sub>KPC</sub>* (3 chủng, 37,5%), *bla<sub>NDM</sub>* (2 chủng, 25,0%), *bla<sub>OXA-48-like</sub>* (1 chủng, 12,5%); các chủng mang tổ hợp 2 gen chiếm 25,0% (2/8) gồm *bla<sub>KPC</sub> + NDM* (1 chủng, 12,5%) và *bla<sub>NDM</sub> + OXA-48-like* (1 chủng, 12,5%); không phát hiện được chủng nào mang gen *bla<sub>IMP</sub>* và *bla<sub>VIM</sub>* (bảng 3).

### 4. Bàn luận

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật mPCR được thiết kế để xác định đồng thời 5 gen mã hóa carbapenemase là *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* và *bla<sub>VIM</sub>*, bao gồm mPCR1 (phát hiện 3 gen *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*) và mPCR2 (phát hiện 2 gen *bla<sub>NDM</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>*). Tuy

nhiên, khác với PCR truyền thống, mPCR sử dụng nhiều các cặp mồi có thể xảy ra hiện tượng tương tác lẫn nhau giữa các mồi trong một ống phản ứng, ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại gen đích. Chính vì vậy, cần tiến hành tối ưu thành phần và chu trình nhiệt của mPCR để đảm bảo phát hiện được đồng thời các gen đích quan tâm.

Kết quả tối ưu điều kiện phản ứng ghi nhận hiệu suất khuếch đại của mPCR phụ thuộc chặt chẽ vào cân bằng nồng độ mồi giữa các gen đích cũng như nhiệt độ gắn mồi. Nồng độ mồi tối ưu trong nghiên cứu này dao động từ 0,2 đến 0,5  $\mu\text{M}$ , tương đồng với khoảng nồng độ được D. Doyle và cs (2012) [4] sử dụng trong mPCR phát hiện 5 gen carbapenemase. Việc điều chỉnh nồng độ mồi giữa các gen đích (mPCR1: *bla<sub>KPC</sub>* 0,4  $\mu\text{M}$ , *bla<sub>IMP</sub>* 0,2  $\mu\text{M}$ , *bla<sub>VIM</sub>* 0,3  $\mu\text{M}$ ; mPCR2: *bla<sub>NDM</sub>* 0,5  $\mu\text{M}$  và *bla<sub>OXA-48-like</sub>* 0,3  $\mu\text{M}$ ) giúp đạt sản phẩm gen đích đặc hiệu, không có băng phụ. Điều này là hợp lý vì mPCR thường cần cân bằng nồng độ mồi theo mức độ ưu thế khuếch đại của từng cặp mồi. Thực tế, kết quả tối ưu nồng độ mồi *bla<sub>VIM</sub>* trong nghiên cứu của nhóm tác giả tương đương với nghiên cứu của D. Doyle và cs (2012) [4], trong khi *bla<sub>KPC</sub>* và *bla<sub>NDM</sub>* cao hơn nhằm cải thiện hiệu suất khuếch đại và *bla<sub>IMP</sub>* và *bla<sub>OXA-48-like</sub>* được giảm để hạn chế khuếch đại ưu thế và cạnh tranh giữa các mồi. Cách thiết kế này giúp giảm số lượng cặp mồi trong mỗi phản ứng, hạn chế cạnh tranh và tương tác giữa các mồi, đồng thời thuận lợi hơn trong tối ưu hóa và đọc kết quả trên gel. Sự khác biệt về nồng độ mồi giữa các gen phản ánh yêu cầu tối ưu hóa riêng trong điều kiện xét nghiệm của từng nghiên cứu. Việc chia các gen đích thành 2 phản ứng mPCR cũng phù hợp với cách tiếp cận của L. Poirel và cs (2011) [10], trong đó, các gen carbapenemase được phân nhóm vào nhiều phản ứng mPCR thay vì gộp toàn bộ vào một ống phản ứng. Điều này chứng minh, việc tối ưu nồng độ mồi theo từng gen đích như nghiên cứu của nhóm tác giả là bước quan trọng để giảm cạnh tranh và hạn chế sản phẩm phụ trong mPCR (hình 1B).

Với mPCR1, khi tăng nhiệt độ gắn mồi từ 54 lên 58°C, số lượng và cường độ băng gen đích không đồng đều, trong đó 54°C cho đầy đủ 3 băng đặc hiệu kích thước tương ứng với *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* và không xuất hiện băng phụ. Điều này phản ánh đặc trưng của mPCR là sự cạnh tranh giữa các cặp mồi, đặc biệt khi các mồi có  $T_m$  và hiệu suất khuếch đại khác nhau, cần lựa chọn nhiệt độ gắn mồi phù hợp [12]. Trong khi đó, với mPCR2, tín hiệu ổn định ở cả 54, 56, 58°C, việc chọn nhiệt độ gắn mồi 58°C nhằm tăng tính đặc hiệu (hình 2). Điều này cũng tương đồng với nghiên cứu của R. Hatrongjit và cs (2023) [13], khi phản ứng mPCR với bước gắn mồi/kéo dài ở 62,5°C, chứng minh nhiều phản ứng mPCR phát hiện các gen mã hoá carbapenemase có thể tối ưu ở vùng nhiệt độ tương đối cao với thiết kế mồi phù hợp.

Kết quả nghiên cứu ghi nhận giới hạn phát hiện của *bla<sub>IMP</sub>* là  $10^6$  copy/ml, *bla<sub>KPC</sub>* là  $10^9$  copy/ml, *bla<sub>VIM</sub>* là  $10^3$  copy/ml, *bla<sub>NDM</sub>* là  $10^7$  copy/ml, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* là  $10^5$  copy/ml (hình 3). LOD của các gen đích trong nghiên cứu dao động từ  $10^3$  đến  $10^9$  copy/ml, trong đó *bla<sub>KPC</sub>* có LOD cao nhất. Điều này ghi nhận độ nhạy phân tích của phản ứng đối với *bla<sub>KPC</sub>* còn hạn chế so với các hệ thống real-time PCR sử dụng probe đặc hiệu như nghiên cứu của M. Wei và cs (2024) [14] ( $2 \times 10^2$ - $8 \times 10^2$  copy/ml). Sự khác biệt này có thể được giải thích bởi khác biệt về phương pháp, bao gồm việc sử dụng plasmid chuẩn, DNA tinh sạch, hệ thống real-

time PCR với probe đặc hiệu...; trong khi nghiên cứu của nhóm tác giả sử dụng DNA tách bằng sốc nhiệt từ khuẩn lạc cho mPCR. Phương pháp tách DNA bằng sốc nhiệt có ưu điểm là đơn giản, nhanh chóng, tiết kiệm chi phí, không phụ thuộc vào bộ kit tách chiết thương mại và dễ triển khai trong điều kiện phòng xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Về ý nghĩa lâm sàng, nếu quy trình mPCR này được áp dụng trực tiếp trên bệnh phẩm có tải lượng vi khuẩn thấp hoặc mẫu có nhiều chất ức chế PCR, LOD cao của *bla*<sub>KPC</sub> có thể làm tăng nguy cơ âm tính giả. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, xét nghiệm được thực hiện trên DNA tách bằng sốc nhiệt từ khuẩn lạc *K. pneumoniae* sau nuôi cấy, không phải từ bệnh phẩm trực tiếp. Trong điều kiện đã có khuẩn lạc thuần, lượng vi khuẩn và DNA đích thường cao hơn, do đó, LOD cao có thể ít ảnh hưởng hơn đến khả năng phát hiện gen so với xét nghiệm trực tiếp từ mẫu lâm sàng. Vì vậy, quy trình mPCR hiện tại phù hợp hơn với mục tiêu sàng lọc định tính các gen carbapenemase trên chủng phân lập sau nuôi cấy. Bên cạnh đó, cần tiếp tục tối ưu hoặc sử dụng các kỹ thuật nhạy hơn như real-time PCR khi hướng tới phát hiện trực tiếp từ bệnh phẩm. Việc sử dụng phương pháp này là phù hợp với mục tiêu của nghiên cứu, vốn tập trung vào phát hiện định tính các gen carbapenemase, thay vì định lượng số bản sao hay phân tích cấu trúc di truyền chuyên sâu. Kết quả này có thể phản ánh sự đánh đổi giữa độ nhạy phân tích tối ưu và tính khả thi của quy trình trong sàng lọc nhanh các chủng vi khuẩn lâm sàng.

Khi đánh giá thử nghiệm mPCR tối ưu trên 30 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng, ghi nhận tỷ lệ phân bố nhóm gen mã hoá carbapenemase có sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm. Trong đó, số chủng không mang gen đích chiếm tỷ lệ cao nhất với 73,3% (22/30); trong 8 chủng (26,7%) mang gen carbapenem, các chủng đơn gen chiếm 75,0% (6/8) gồm *bla*<sub>KPC</sub> (3 chủng, 37,5%), *bla*<sub>NDM</sub> (2 chủng, 25,0%), *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (1 chủng, 12,5%); các chủng mang tổ hợp 2 gen chiếm 25,0% (2/8) gồm *bla*<sub>KPC</sub> + *NDM* (1 chủng, 12,5%) và *bla*<sub>NDM</sub> + *OXA-48-like* (1 chủng, 12,5%). Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả có điểm tương đồng với nghiên cứu của L.T.V. Nga và cs (2026) [15] khi ghi nhận sự đa dạng về kiểu gen mã hóa carbapenemase ở *K. pneumoniae*, trong đó các chủng mang đơn gen vẫn chiếm ưu thế so với tổ hợp hai gen (45,9 và 43,2%). Tuy nhiên, tỷ lệ đơn gen trong nghiên cứu của nhóm tác giả cao hơn nhiều so với nghiên cứu của họ (75,0 và 45,9%).

Một điểm đáng chú ý trong nghiên cứu này là *bla*<sub>KPC</sub> chiếm tỷ lệ cao nhất trong nhóm chủng mang gen carbapenemase với tỷ lệ 37,5% (3/8), trong khi một số nghiên cứu trước đây tại Việt Nam ghi nhận *bla*<sub>NDM</sub> và *bla*<sub>OXA-48-like</sub> thường chiếm ưu thế [16, 17]. Sự khác biệt này có thể liên quan đến tiêu chí chọn mẫu, đặc điểm dịch tễ tại từng cơ sở, áp lực sử dụng kháng sinh hoặc sự lưu hành cục bộ của các dòng *K. pneumoniae* mang *bla*<sub>KPC</sub>. Tuy nhiên, do nghiên cứu chỉ khảo sát 30 chủng được lựa chọn ngẫu nhiên và số chủng mang gen còn ít nên kết quả này cần được diễn giải thận trọng và kiểm chứng thêm trên cỡ mẫu lớn hơn. Bên cạnh đó, nghiên cứu của nhóm tác giả không ghi nhận sự hiện diện của *bla*<sub>VIM</sub> và *bla*<sub>IMP</sub>. Việc không phát hiện chủng mang gen *bla*<sub>VIM</sub> và *bla*<sub>IMP</sub> trong nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu trước [16, 17]. Điều này ghi nhận *bla*<sub>VIM</sub> và *bla*<sub>IMP</sub> có thể chưa phải là gen mã hóa carbapenemase phổ biến trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, do tính chất di động cao của các

plasmid mang gen carbapenemase, nguy cơ xuất hiện và lan rộng của *bla<sub>VIM</sub>* và *bla<sub>IMP</sub>* trong tương lai vẫn cần được theo dõi chặt chẽ.

Kết quả của nhóm tác giả chưa được so sánh với kit PCR thương mại để phát hiện gen mã hóa carbapenemase của *K. pneumoniae*. Vì vậy, nghiên cứu mới chỉ chứng minh khả năng thiết lập và ứng dụng bước đầu của quy trình. Bên cạnh đó, quy trình sử dụng DNA tách bằng sốc nhiệt và đọc kết quả trên gel điện di nên có thể chịu ảnh hưởng bởi chất lượng DNA, thao tác kỹ thuật và khả năng quan sát băng khuếch đại. Do đó, cần có các nghiên cứu tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn, so sánh trực tiếp với kit thương mại hoặc phương pháp tham chiếu. Mặt khác, phản ứng mPCR trong nghiên cứu này vẫn cần cải thiện giới hạn phát hiện để nâng cao hiệu quả chẩn đoán. Tuy nhiên, so với phương pháp dựa trên kiểu hình, mPCR cho phép xác định trực tiếp các gen kháng, giúp phát hiện cơ chế kháng ngay cả khi kiểu hình chưa biểu hiện rõ ràng hoặc còn nhạy cảm ở mức cận ngưỡng [18]. Điều này đặc biệt quan trọng trong bối cảnh một số chủng mang gen nhưng vẫn còn nhạy cảm trên kháng sinh đồ, có thể do mức biểu hiện gen hoặc yếu tố điều hòa. Bên cạnh đó, mPCR giúp rút ngắn thời gian chẩn đoán, hỗ trợ lựa chọn kháng sinh phù hợp sớm hơn, từ đó góp phần kiểm soát lây lan vi khuẩn kháng thuốc trong bệnh viện.

## 5. Kết luận

Nhóm tác giả đã xây dựng và tối ưu hoá thành công hai quy trình xét nghiệm mPCR để phát hiện 5 gen kháng carbapenem gồm *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48-like</sub>* trên *K. pneumoniae* sử dụng phương pháp sốc nhiệt để tách DNA tại Bệnh viện Quân y 103. Điều kiện tối ưu được xác định ở nhiệt độ gắn mồi 54°C với mPCR1 và 58°C với mPCR2. Nồng độ mồi 0,2-0,5  $\mu$ M tùy từng gen. Giới hạn phát hiện lần lượt là *bla<sub>VIM</sub>*  $10^3$ , *bla<sub>OXA-48-like</sub>*  $10^5$ , *bla<sub>IMP</sub>*  $10^6$ , *bla<sub>NDM</sub>*  $10^7$  và *bla<sub>KPC</sub>*  $10^9$  copy/ml. Khi ứng dụng trên 30 chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu lâm sàng, có 26,7% chủng mang gen đích, trong đó *bla<sub>KPC</sub>* chiếm tỷ lệ cao nhất. Quy trình này có ưu điểm đơn giản, nhanh, tiết kiệm chi phí và phù hợp với điều kiện xét nghiệm vi sinh lâm sàng. Tuy nhiên, cần tiếp tục mở rộng cỡ mẫu và so sánh với kit thương mại hoặc phương pháp phân tử tham chiếu để đánh giá đầy đủ độ nhạy, độ đặc hiệu và giá trị ứng dụng thường quy của xét nghiệm.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ môn - Khoa Vi sinh vật, Bệnh viện Quân y 103, Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y đã tạo điều kiện hỗ trợ nghiên cứu.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] H. Sati, E. Carrara, A. Savoldi, et al. (2025), “The WHO bacterial priority pathogens list 2024: A prioritisation study to guide research, development, and public health strategies against antimicrobial resistance”, *Lancet Infect. Dis.*, **25**, pp.1033-1043, DOI: 10.1016/S1473-3099(25)00118-5.

[2] R. Podschun, U. Ullmann (1998), “*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors”, *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**(4), pp.589-603, DOI: 10.1128/CMR.11.4.589.

[3] W. Liu, G. Chen, K. Dou, et al. (2023), “Eugenol eliminates carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* via reactive oxygen species mechanism”, *Front. Microbiol.*, **14**, DOI: 10.3389/fmicb.2023.1090787.

[4] D. Doyle, G. Peirano, C. Lascols, et al. (2012), “Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases”, *J. Clin. Microbiol.*, **50**(12), pp.3877-3880, DOI: 10.1128/JCM.02117-12.

[5] E.M. Elnifro, A.M. Ashshi, R.J. Cooper, et al. (2000), “Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology”, *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**(4), pp.559-570, DOI: 10.1128/CMR.13.4.559-570.2000.

[6] A. Noweiska, R. Bobrowska, J. Sychała, et al. (2023), “Multiplex PCR assay for the simultaneous identification of race-specific and non-specific leaf resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *J. Appl. Genet.*, **64**(1), pp.55-64, DOI: 10.1007/s13353-022-00745-5.

[7] T.T. Le, Q.M. Do, T.T.H. Le, et al. (2024), “Initial establishment of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of common colistin and carbapenemase genes”, *Vietnam Journal of Science and Technology*, **62**(3), pp.521-529, DOI: 10.15625/2525-2518/19130.

[8] T.A. Nguyen, T.T.T. Le, C.T. Phan, et al. (2023), “Development of multiplex PCR assay for detection of *Candida* spp.”, *Vietnam Med. J.*, **521**(1), DOI: 10.51298/vmj.v521i1.3987 (in Vietnamese).

[9] H. Yigit, A.M. Queenan, G.J. Anderson, et al. (2001), “Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**(4), pp.1151-1161, DOI: 10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.

[10] L. Poirel, T.R. Walsh, V. Cuvillier, et al. (2011), “Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes”, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **70**(1), pp.119-123, DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.

[11] J.D.D. Pitout, D.B. Gregson, L. Poirel, et al. (2005), “Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory”, *J. Clin. Microbiol.*, **43**(7), pp.3129-3135, DOI: 10.1128/JCM.43.7.3129-3135.2005.

[12] M. Watahiki, R. Kawahara, M. Suzuki, et al. (2020), “Single-tube multiplex polymerase chain reaction for the detection of genes encoding *Enterobacteriaceae* carbapenemase”, *Jpn. J. Infect. Dis.*, **73**(2), pp.166-172, DOI: 10.7883/yoken.JJID.2019.041.

[13] R. Hatrongjit, P. Chopjitt, P. Boueroy, et al. (2023), “Multiplex PCR detection of common carbapenemase genes and identification of clinically relevant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* complex”, *Antibiotics*, **12(1)**, pp.1-10, DOI: 10.3390/antibiotics12010076.

[14] M. Wei, X. Chen, J. Liu, et al. (2024), “Development and validation of a novel multiplex real-time PCR assay for rapid detection of carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Enterobacterales* isolates and clinical samples”, *Infect. Drug Resist.*, **17**, pp.3451-3462, DOI: 10.2147/IDR. S475630.

[15] L.T.V. Nga, N.T.T. Hoa (2026), “Value of rapid carbapenemase detection and its association with ceftazidime/avibactam resistance phenotype in gram-negative bacteria at Thanh Nhan Hospital, 2025”, *Vietnam Med. J.*, **559(1)**, pp.362-367, DOI: 10.51298/vmj.v559i1.17444 (in Vietnamese).

[16] L.K. Van, Q.T. Lam, P.M. Phuong (2025), “Carbapenemase gene co-operate with ESBL, AmpC in antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*”, *Vietnam Med. J.*, **547(3)**, pp.252-256, DOI: 10.51298/vmj.v547i3.13212 (in Vietnamese).

[17] V.T. Quynh, V.T. Ha, V.T. Diep, et al. (2025), “Application of multiplex PCR for genotyping carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates”, *J. Med. Res.*, **186(1)**, pp.86-94, DOI: 10.52852/tcncyh.v186i1.2927 (in Vietnamese).

[18] F.I. Enyinnaya, P. Cruz, M.P. Buttner, et al. (2017), “Comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute standards in antimicrobial susceptibility among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*”, *Future Sci. OA*, **3(4)**, DOI: 10.4155/fsoa-2017-0095.