

- bệnh viện đa khoa thành phố cần thơ năm 2021. Tạp chí Y học Việt Nam. 2022; 515(2)
5. **Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD.** Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. Virulence. 2012;3(3):243-250.
 6. **Cường BT, Trọng NV, Mạnh ND.** Tỷ lệ phân lập được và đặc điểm kháng kháng sinh của Acinetobacter baumannii tại Bệnh viện Trung ương Quân đội 108 năm 2017. Journal of 108-Clinical Medicine and Pharmacy. 2019;
 7. **Thirapanmethee K, Srisiri-A-Nun T, Houngsaitong J, Montakantikul P, Khuntayaporn P, Chomnawang MT.** Prevalence of OXA-type β -lactamase genes among carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii clinical isolates in Thailand. Antibiotics. 2020;9(12):864.
 8. **Phan TXQ, Võ PMT.** Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng, sự đề kháng kháng sinh và kết quả điều trị viêm phổi bệnh viện do vi khuẩn acinetobacter baumannii tại khoa hồi sức tích cực - chống độc bệnh viện đa khoa trung ương cần thơ. Tạp chí Y Dược học Cần Thơ. 06/21 2023;(30):7-14.
 9. **Diep DTH, Tuan HM, Ngọc KM, et al.** The clinical features and genomic epidemiology of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections at a tertiary hospital in Vietnam. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2023;33:267-275.
 10. **Huyền MTT, Duy ND, Lân NH.** Các vi khuẩn thường gặp và tính đề kháng kháng sinh của chúng tại Bệnh viện Phạm Ngọc Thạch từ 11. 2016;

XÂY DỰNG VÀ TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH PCR ĐA MỒI PHÁT HIỆN ĐỒNG THỜI CÁC GEN bla_{OXA} TRÊN ACINETOBACTER BAUMANNII KHÁNG CARBAPENEM

Nguyễn Sĩ Tuấn^{1,2}, Trần Việt Lãm²,
Lê Duy Nhất², Huỳnh Minh Tuấn¹

TÓM TẮT

Acinetobacter baumannii là tác nhân gây nhiễm khuẩn bệnh viện quan trọng, nổi bật bởi khả năng kháng nhiều loại kháng sinh, đặc biệt là carbapenem, chủ yếu thông qua cơ chế sản xuất β -lactamase nhóm OXA. Trước tình trạng gia tăng các chủng đa kháng thuốc, nhu cầu về các phương pháp chẩn đoán nhanh, chính xác và chi phí hợp lý trở nên cấp thiết. Nghiên cứu này xây dựng và tối ưu hóa quy trình PCR đa mồi (multiplex PCR) nhằm phát hiện đồng thời bốn gen mục tiêu: 16S-rRNA, bla_{OXA-23} , bla_{OXA-51} và bla_{OXA-58} , phục vụ định danh và đánh giá khả năng kháng thuốc của A. baumannii. Các điều kiện phản ứng được khảo sát hệ thống, bao gồm nhiệt độ lai, nồng độ mồi, nồng độ dNTP, lượng Taq DNA polymerase, giới hạn phát hiện và độ đặc hiệu của từng cặp mồi. Quy trình tối ưu sử dụng nhiệt độ lai 58°C, nồng độ mồi 0,15 μ M, dNTP 0,25 mM và Taq DNA polymerase 1,25U, đạt giới hạn phát hiện 10 CFU/ml mà không ghi nhận dương tính giả. Kết quả giải trình tự và phân tích BLAST khẳng định độ đặc hiệu tuyệt đối của các cặp mồi. Quy trình multiplex PCR này có tiềm năng ứng dụng cao trong vi sinh lâm sàng, hỗ trợ phát hiện sớm và chính xác các chủng A. baumannii kháng carbapenem, từ đó góp phần nâng cao hiệu quả kiểm soát nhiễm khuẩn và tối ưu hóa điều trị kháng sinh.

Từ khóa: Multiplex PCR, bla_{OXA-23} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA-58} , 16S-rRNA, Acinetobacter baumannii

¹Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất tỉnh Đồng Nai

Chịu trách nhiệm chính: Huỳnh Minh Tuấn

Email: huynh.tuan@umc.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.9.2025

Ngày phản biện khoa học: 24.10.2025

Ngày duyệt bài: 25.11.2025

SUMMARY

DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A MULTIPLEX PCR ASSAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF bla_{OXA} GENES IN CARBAPENEM-RESISTANT ACINETOBACTER BAUMANNII

Acinetobacter baumannii is a clinically significant nosocomial pathogen, characterized by its remarkable multidrug resistance, particularly to carbapenems, predominantly mediated via OXA-type β -lactamases. The escalating prevalence of multidrug-resistant strains underscores the urgent need for rapid, accurate, and cost-effective diagnostic tools. This study developed and optimized a multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for the simultaneous detection of four target genes—16S-rRNA, bla_{OXA-23} , bla_{OXA-51} , and bla_{OXA-58} —aimed at species identification and antimicrobial resistance profiling of A. baumannii. Systematic optimization included evaluation of annealing temperature, primer concentration, dNTP concentration, Taq DNA polymerase dosage, detection limit, and primer specificity. The optimized assay employed an annealing temperature of 58°C, primer concentration of 0.15 μ M, dNTP concentration of 0.25 mM, and Taq DNA polymerase at 1.25 U, achieving a detection limit of 10 CFU/ml with no false positives. Sequence verification and BLAST analysis confirmed 100% specificity for all primer sets. This multiplex PCR protocol represents a rapid, highly specific, and resource-efficient molecular diagnostic approach, with strong potential for integration into clinical microbiology workflows to facilitate early detection and surveillance of carbapenem-resistant A. baumannii, thereby enhancing infection control and antimicrobial stewardship.

Keywords: Multiplex PCR, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58}, 16S-rRNA, Acinetobacter baumannii

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Acinetobacter baumannii là trực khuẩn Gram âm không lên men, gây nhiễm khuẩn bệnh viện nghiêm trọng, đặc biệt ở bệnh nhân điều trị dài ngày hoặc tại ICU. Khả năng tồn tại bền vững và kháng đa thuốc khiến vi khuẩn này trở thành mối đe dọa toàn cầu.

Tỷ lệ kháng carbapenem ngày càng tăng, chủ yếu do β -lactamase nhóm OXA, gồm bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51} và bla_{OXA-58} [1]. bla_{OXA-51} là gen nội sinh, trong khi bla_{OXA-23} và bla_{OXA-58} thường nằm trên plasmid và lây truyền ngang [2].

Phát hiện nhanh và đồng thời các gen này giúp định danh chính xác, hỗ trợ điều trị và giám sát dịch tễ. Các phương pháp truyền thống tốn thời gian, độ nhạy thấp và thiếu thông tin phân tử; trong khi multiplex PCR cho phép khuếch đại nhiều gen trong một phản ứng, rút ngắn thời gian, giảm chi phí và tăng hiệu quả [3].

Một số quy trình đã được công bố, nhưng hiệu quả phụ thuộc điều kiện phòng thí nghiệm và chủng lưu hành. Nghiên cứu này nhằm xây dựng, tối ưu hóa multiplex PCR phát hiện 16S-rRNA, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58}, góp phần cung cấp công cụ chẩn đoán nhanh, đặc hiệu và khả thi tại Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế thí nghiệm và nguồn mẫu.

Các chủng Acinetobacter baumannii lâm sàng thu thập tại Bệnh viện Đa khoa Thống Nhất được định danh bằng hệ thống PHOENIX M100 và xác nhận gen bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58} bằng giải trình tự Sanger.

Bộ mẫu tối ưu gồm:

- **Nhóm dương tính:** ≥ 3 chủng dương tính với từng gen bla_{OXA}.

- **Nhóm âm tính:** ≥ 6 chủng A. baumannii không mang gen mục tiêu và các trực khuẩn Gram âm khác.

Quy trình tối ưu hóa gồm hai bước: (i) khảo sát singleplex PCR xác định điều kiện tối ưu cho từng cặp môi; (ii) tích hợp vào multiplex PCR và điều chỉnh thông số. Mỗi điều kiện được lặp lại hai lần độc lập.

DNA vi khuẩn được chiết bằng phương pháp đun sôi cải tiến, định lượng bằng NanoDrop, bảo quản ở -20°C cho các phản ứng PCR tiếp theo [4].

2.2. Thiết kế và kiểm tra môi đặc hiệu.

Trình tự môi cho bốn gen 16S-rRNA, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58} được thiết kế từ dữ liệu GenBank (NCBI), phân tích bằng Primer3 và kiểm tra đặc tính (Tm, GC%, kẹp tóc, dimer)

cùng tính đặc hiệu qua BLASTn. Môi do IDT (USA) tổng hợp, hoàn nguyên bằng nước DEPC và bảo quản ở -20°C.

Bảng 1. Trình tự môi và kích thước sản phẩm các gen trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự	Kích thước sản phẩm
1	16S F	TGCATTCGATACT GGTGAGC	370 bp
	16S R	CTAGTATGTCAAG GCCAGGTAAG	
2	OXA23 F	AAATGTTGAATGC CCTGATCGGATTG	422 bp
	OXA23 R	ATCCATTGCCCAA CCAGTCTTTCC	
3	OXA51 F	ACCATAAGGCAAC CACCACAGAAG	194 bp
	OXA51 R	ATCTGCATTGCCA TAACCAACACG	
4	OXA58 F	TCAAGAATTGGCA CGTCGTATTGG	306 bp
	OXA58 R	AAACCCACATACC AACCCACTTG	

2.3. Tối ưu hóa điều kiện phản ứng đơn môi (singleplex PCR). Mỗi cặp môi được khảo sát riêng và lặp lại 2 lần:

- Nhiệt độ lai: thử 56°C, 58°C, 60°C dựa trên Tm, đánh giá qua độ rõ và kích thước băng điện di.
- Nồng độ môi: 0,05–0,4 μ M; quá thấp khuếch đại kém, quá cao gây phản ứng chéo.
- Giới hạn phát hiện: DNA pha loãng 10⁶–10¹ CFU/ml; LoD xác định khi $\geq 95\%$ phản ứng phát hiện được mục tiêu.

- Giải trình tự: sản phẩm PCR được giải trình tự Sanger, BLAST xác nhận tương đồng tuyệt đối với gen mục tiêu.

2.4. Khảo sát điều kiện tối ưu hóa multiplex PCR. Hai thông số chính được tối ưu:

- dNTP: khảo sát 0,15–0,4 mM; quá thấp thiếu nucleotide, quá cao giảm hiệu quả bắt cặp [5].

- Taq DNA polymerase: thử 1,0–2,0 U/25 μ L; quá thấp khuếch đại yếu, quá cao gây ức chế và tạo sản phẩm phụ [6].

2.5. Thành phần và chu kỳ phản ứng multiplex PCR

Thành phần chuẩn hóa cho phản ứng multiplex PCR gồm:

- Taq DNA polymerase: 1,25 U
- 1X PCR buffer chứa MgCl₂
- Mỗi cặp môi: 0,15 μ M
- dNTPs: 0,25 mM
- DNA khuôn: 5 μ L
- DEPC H₂O bổ sung đủ 25 μ L

Chu kỳ nhiệt:

- Biến tính ban đầu: 95°C, 10 phút

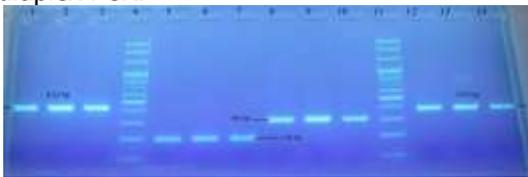
- 40 chu kỳ gồm:
 - Biến tính: 94°C, 45 giây
 - Gắn mồi: 58°C, 45 giây
 - Kéo dài: 72°C, 60 giây
 - Kéo dài cuối: 72°C, 5 phút

2.6. Phân tích sản phẩm PCR. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 2%, nhuộm ethidium bromide, chạy ở 100V trong 30 phút. Hình ảnh được ghi nhận dưới đèn UV với hệ thống Gel Doc. Kết quả được so sánh với thang chuẩn DNA 100 bp để xác định kích thước sản phẩm khuếch đại.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng đơn mồi. Để đảm bảo tính hiệu quả và độ đặc hiệu của từng cặp mồi trước khi tích hợp vào phản ứng multiplex PCR, các điều kiện phản ứng đơn mồi (singleplex PCR) được khảo sát riêng biệt với mục tiêu xác định nhiệt độ lai (annealing temperature) và nồng độ mồi (primer concentration) tối ưu cho mỗi cặp.

3.1.1. Khảo sát nhiệt độ lai. PCR ở 56°C, 58°C, 60°C đều cho sản phẩm rõ, nhưng 58°C cho băng sắc nét, đồng nhất, không sản phẩm phụ, đảm bảo đặc hiệu và phù hợp tối ưu hóa multiplex PCR.



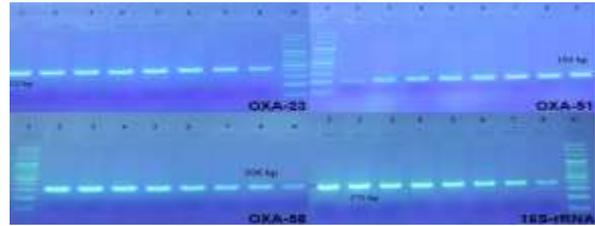
Hình 1. Kết quả khảo sát nhiệt độ lai của bốn cặp mồi OXA-23, OXA-51, OXA-58 và 16S-rRNA

Chú thích:

- 1 – 3: Kết quả khảo sát nhiệt độ lai cặp mồi OXA 23 ở Ta lần lượt: 56, 58, 60°C.
- 4: Thang DNA chuẩn
- 5 – 7: Kết quả khảo sát nhiệt độ lai cặp mồi OXA 51 ở Ta lần lượt: 56, 58, 60°C
- 8 – 10: Kết quả khảo sát nhiệt độ lai cặp mồi OXA 58 ở Ta lần lượt: 56, 58, 60°C.
- 11: Thang DNA chuẩn
- 12 – 14: Kết quả khảo sát nhiệt độ lai cặp mồi 16S ở Ta lần lượt: 56, 58, 60°C.

3.1.2. Khảo sát nồng độ mồi. Thử 0,05–0,4 µM, kết quả cho thấy 0,15 µM tạo băng rõ, ổn định, không nhiễu; nồng độ thấp cho sản phẩm mờ, cao ($\geq 0,3$ µM) dễ xuất hiện băng phụ do lai chéo hoặc phản ứng phụ.

Hình 2. Kết quả khảo sát nồng độ mồi tối ưu các cặp mồi OXA-23, OXA-51, OXA-58 và 16S-rRNA



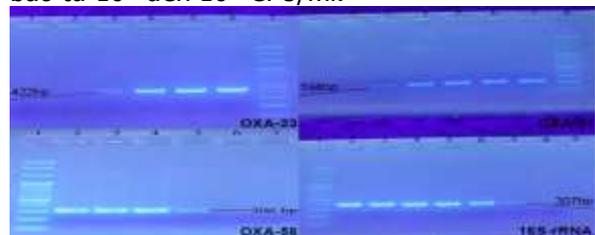
Chú thích: OXA-23:

- 1-8: Nồng độ mỗi lần lượt là 0,4; 0,35; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 microMol
- 9: Thang DNA chuẩn
- OXA-51:
 - 1: Thang DNA chuẩn
 - 2-9: Nồng độ mỗi lần lượt là 0,05; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4 microMol
- OXA-58:
 - 1: Thang DNA chuẩn
 - 2-9: Nồng độ mỗi lần lượt là 0,4; 0,35; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 microMol
- 16S-rRNA:
 - 1-8: Nồng độ mỗi lần lượt là 0,4; 0,35; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,05 microMol
 - 9: Thang DNA chuẩn

3.1.3. Đánh giá tính đặc hiệu và khả năng ứng dụng. Sản phẩm PCR đơn mồi được giải trình tự và BLAST xác nhận 100% tương đồng với gen mục tiêu (E-value ≈ 0), chứng tỏ mồi đặc hiệu, đủ điều kiện tích hợp vào multiplex PCR. Các khảo sát đã xác lập thông số tối ưu cho từng cặp mồi, làm nền tảng triển khai hiệu quả.

3.2. Giới hạn phát hiện và độ đặc hiệu

3.2.1. Giới hạn phát hiện (Limit of Detection – LOD). Khả năng phát hiện mục tiêu ở nồng độ thấp là yếu tố then chốt trong việc đánh giá độ nhạy của một hệ thống PCR. Trong nghiên cứu này, giới hạn phát hiện được xác định thông qua phản ứng đơn mồi với chuỗi pha loãng thập phân từ các dung dịch DNA được chiết từ *A. baumannii*, tương ứng với nồng độ tế bào từ 10^6 đến 10^1 CFU/ml.



Hình 3. Kết quả khảo sát giới hạn phát hiện gen của các cặp mồi OXA-23, OXA-51, OXA-58 và 16S-rRNA

Chú thích:

- OXA-23: 1: Chứng âm (nước cất); 7: Thang DNA chuẩn; 2-6: Nồng độ DNA tách chiết ban đầu, lần lượt là $1; 10; 10^2; 10^3; 10^4$ CFU/ml.

OXA-51:

1: Chứng âm (nước cất); 7: Thang DNA chuẩn; 2-6: Nồng độ DNA tách chiết ban đầu, lần lượt là 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 CFU/ml.

OXA-58: 1: Chứng âm (nước cất); 7: Thang DNA chuẩn; 2-6: Nồng độ DNA tách chiết ban đầu, lần lượt là 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 CFU/ml.

16S-rRNA: 1: Thang DNA chuẩn; 9: Chứng âm (nước cất); 2-8: Nồng độ DNA ban đầu, lần lượt là 10^6 ; 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 ; 10^0 CFU/ml.

Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy cả bốn cặp môi đều có khả năng khuếch đại sản phẩm đặc hiệu ở mức thấp nhất là 10 CFU/ml. Mức phát hiện này tương đương hoặc vượt trội so với nhiều nghiên cứu trước đó ứng dụng kỹ thuật PCR để phát hiện vi sinh vật kháng thuốc. Hiệu suất này cho thấy quy trình không chỉ nhạy mà còn đủ mạnh để ứng dụng vào phát hiện mẫu lâm sàng có tải lượng vi khuẩn thấp, chẳng hạn như dịch sinh học hoặc mẫu huyết thanh.

3.2.2. Độ đặc hiệu (Specificity). Để xác nhận độ đặc hiệu của các cặp môi thiết kế, sản phẩm khuếch đại đặc trưng được tinh sạch bằng bộ kit PCR purification (nếu hãng nếu có), sau đó được giải trình tự theo phương pháp Sanger. Kết quả phân tích BLAST cho thấy các trình tự có độ tương đồng tuyệt đối (Ident = 100%) với các gen mục tiêu tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank – không có sai lệch hoặc trùng khớp không đặc hiệu. Giá trị E-value thu được đều nhỏ hơn $1e-150$, cho thấy mức độ tương đồng không thể xảy ra một cách ngẫu nhiên.

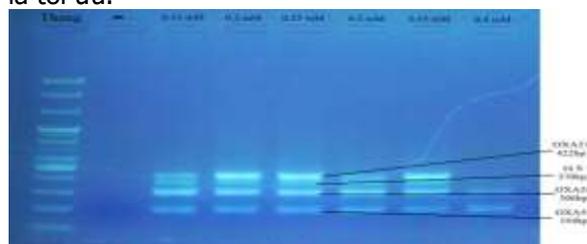
Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc thiết kế môi dựa trên các vùng trình tự bảo tồn cao và có kiểm chứng chéo bằng công cụ sinh tin học như BLAST có thể đảm bảo độ đặc hiệu gần như tuyệt đối trong phản ứng PCR [7].

3.2.3. Ý nghĩa ứng dụng. Độ nhạy cao (LOD = 10 CFU/ml) kết hợp với độ đặc hiệu tuyệt đối giúp đảm bảo rằng quy trình PCR không những phù hợp cho nghiên cứu mà còn khả thi để ứng dụng trong thực hành xét nghiệm lâm sàng. Trong bối cảnh các bệnh viện cần các phương pháp chẩn đoán nhanh và đáng tin cậy nhằm phát hiện sớm các chủng *A. baumannii* kháng carbapenem, quy trình này có thể đóng vai trò như một công cụ hỗ trợ quyết định điều trị kịp thời và kiểm soát lây nhiễm hiệu quả [3].

3.3. Tối ưu hóa phản ứng multiplex PCR. Phản ứng PCR đa môi (multiplex PCR) yêu cầu sự tinh chỉnh tỉ mỉ các điều kiện phản ứng nhằm đảm bảo sự khuếch đại đồng thời và hiệu quả của nhiều mục tiêu gen trong cùng một phản ứng. Việc tối ưu hóa các thông số như

nồng độ dNTP, nồng độ enzyme Taq DNA polymerase và thành phần buffer là bắt buộc để đảm bảo sự cân bằng giữa các cặp môi, tránh hiện tượng cạnh tranh không đặc hiệu và sai lệch cường độ khuếch đại.

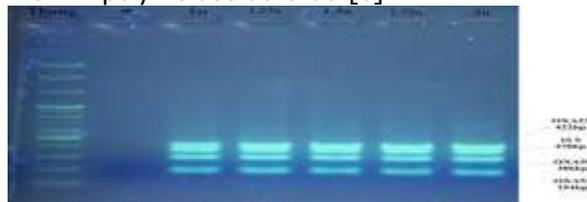
3.3.1. Khảo sát nồng độ dNTP. Các mức nồng độ dNTP từ 0,15 mM đến 0,4 mM được thử nghiệm để đánh giá ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại. Kết quả cho thấy ở mức 0,15 mM, sản phẩm PCR thu được có cường độ yếu, đặc biệt là các gen có kích thước lớn hơn như OXA-23 (422 bp). Trong khi đó, tại mức 0,25 mM, tất cả các băng khuếch đại xuất hiện rõ ràng, sắc nét và đồng đều về cường độ, cho thấy mức này là tối ưu.



Hình 4. Kết quả khảo sát nồng độ dNTP trong phản ứng multiplex PCR phát hiện gen bla_{OXA}

Ở nồng độ 0,4 mM, chỉ còn một số băng được khuếch đại (OXA-51 và OXA-58), phản ánh hiện tượng ức chế phản ứng PCR do nồng độ dNTP quá cao – một hiện tượng đã được ghi nhận trong các nghiên cứu về multiplex PCR, do sự thay đổi độ ổn định của mạch DNA và ảnh hưởng đến hoạt tính của polymerase [5].

3.3.2. Khảo sát nồng độ Taq DNA polymerase. Taq DNA polymerase được khảo sát trong khoảng 1,0 – 2,0 U mỗi phản ứng. Kết quả cho thấy tất cả các mức đều cho phản ứng dương tính, tuy nhiên tại 1,25 U, cường độ khuếch đại đồng đều nhất giữa các cặp môi và không có sự xuất hiện của sản phẩm không đặc hiệu. Mức enzyme cao hơn (1,75 – 2,0 U) không cải thiện cường độ băng nhưng có xu hướng tăng sản phẩm phụ – một dấu hiệu của sự cạnh tranh không mong muốn giữa các khuôn DNA và môi khi polymerase dư thừa [6].



Hình 5. Kết quả khảo sát nồng độ Taq DNA polymerase trong phản ứng multiplex PCR phát hiện các gen bla_{OXA}

3.3.3. Tổng hợp điều kiện tối ưu. Dựa trên kết quả khảo sát, các điều kiện tối ưu cho phản ứng multiplex PCR bao gồm:

- Nhiệt độ lai: 58°C
- Nồng độ mỗi: 0,15 µM cho mỗi loại
- dNTP: 0,25 mM
- Taq polymerase: 1,25 U
- Chu kỳ PCR: 95°C 10 phút → 40 chu kỳ (94°C – 58°C – 72°C) → 72°C 5 phút.

Những điều kiện này đảm bảo khuếch đại đồng thời bốn mục tiêu gen với độ nhạy cao và độ đặc hiệu tuyệt đối, phù hợp với yêu cầu kỹ thuật trong chẩn đoán phân tử. Các kết quả thu được cũng tương thích với khuyến nghị từ các nghiên cứu multiplex PCR trên vi khuẩn Gram âm khác như *Klebsiella pneumoniae* và *Pseudomonas aeruginosa* [3].

IV. BÀN LUẬN

4.1. Phân tích sản phẩm điện di và đánh giá hiệu suất multiplex PCR

4.1.1. Phân tích điện di sản phẩm PCR.

Sản phẩm của phản ứng multiplex PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose 2% nhuộm ethidium bromide và soi dưới tia UV bằng hệ thống Gel Documentation (Bio-Rad). Việc sử dụng thang chuẩn DNA 100 bp cho phép xác định chính xác kích thước sản phẩm của từng cặp môi: 370 bp (16S-rRNA), 422 bp (OXA-23), 194 bp (OXA-51), và 306 bp (OXA-58).

Kết quả điện di cho thấy sự hiện diện rõ ràng của cả bốn băng khuếch đại trong các giếng phản ứng, không ghi nhận sản phẩm phụ hoặc vạch mờ – dấu hiệu cho thấy phản ứng diễn ra ổn định và không có hiện tượng lai chéo giữa các môi. Giếng chứng âm không có băng nào xuất hiện, loại trừ nguy cơ nhiễm mẫu hoặc dương tính giả. Các băng DNA có độ sáng đồng đều, chứng tỏ phản ứng đã được tối ưu hóa tốt về nồng độ mỗi và enzyme, tránh hiện tượng ưu thế cạnh tranh giữa các mục tiêu gen.

4.1.2. Hiệu suất multiplex PCR và tính ứng dụng. Việc khuếch đại đồng thời bốn gen trong một phản ứng duy nhất với hiệu suất đồng đều là một chỉ số quan trọng cho thấy phản ứng multiplex đã đạt trạng thái cân bằng. Đây là yếu tố thiết yếu để có thể ứng dụng phương pháp vào xét nghiệm thực tiễn, nơi mà độ tin cậy và khả năng lặp lại của quy trình là yêu cầu hàng đầu.

So với các phương pháp đơn môi (singleplex PCR), phản ứng multiplex không chỉ tiết kiệm thời gian và chi phí mà còn giảm thiểu rủi ro nhiễm chéo do giảm số lần thao tác. Đặc biệt, trong các cơ sở xét nghiệm có nguồn lực hạn chế, việc ứng dụng multiplex PCR cho phép tăng

cường năng lực phát hiện đồng thời nhiều gene liên quan đến kháng kháng sinh là một lợi thế rõ rệt [5].

4.1.3. So sánh với các nghiên cứu trước. Hiệu suất đạt được trong nghiên cứu này tương đương với hoặc vượt các kết quả đã được công bố. Ví dụ, nghiên cứu của Woodford và cộng sự cũng báo cáo khuếch đại đồng thời ba gene OXA ở *Acinetobacter* spp. bằng multiplex PCR nhưng không bao gồm gen chuẩn nội như 16S-rRNA [3]. Việc bổ sung gen đối chứng nội không chỉ đảm bảo giá trị âm tính thật mà còn giúp đánh giá chất lượng DNA khuôn và điều kiện phản ứng – một cải tiến đáng kể trong thiết kế thử nghiệm chẩn đoán phân tử [8].

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phát triển và tối ưu hóa thành công quy trình PCR đa môi (multiplex PCR) cho phép phát hiện đồng thời bốn gen mục tiêu: 16S-rRNA, bla_{OXA-23}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58} trên các chủng *Acinetobacter baumannii*. Quy trình tối ưu với nhiệt độ lai 58°C, nồng độ mỗi 0,15 µM, dNTP 0,25 mM và Taq DNA polymerase 1,25U, cho phép khuếch đại đặc hiệu, nhạy, với giới hạn phát hiện tới 10 CFU/ml, không ghi nhận dương tính giả và kết quả ổn định qua các lần lặp lại.

Việc tích hợp gen chuẩn nội 16S-rRNA không chỉ nâng cao độ tin cậy của xét nghiệm mà còn đảm bảo đánh giá đồng thời chất lượng mẫu và hiệu quả phản ứng. Phương pháp này mang lại giải pháp chẩn đoán phân tử nhanh, chính xác và hiệu quả cho việc phát hiện các gen kháng carbapenem ở *A. baumannii*.

Trong bối cảnh chúng kháng thuốc ngày càng gia tăng tại bệnh viện, quy trình multiplex PCR này hứa hẹn trở thành công cụ quan trọng trong giám sát, kiểm soát nhiễm khuẩn và hỗ trợ ra quyết định điều trị, góp phần nâng cao hiệu quả chăm sóc và an toàn người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Poirel L, Nordmann P,** (2006), "Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology." *Clinical Microbiology and Infection*, 12(9), 826-36.
2. **Mugnier PD, Poirel L, Naas T, et al.,** (2010), "Worldwide dissemination of the bla_{OXA-23} Carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*1." *Emerging infectious diseases*, 16(1), 35.
3. **Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, et al.,** (2006), "Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp." *International journal of antimicrobial agents*, 27(4), 351-3.
4. **Versalovic J,** (2011), *Manual of clinical microbiology*, American Society for Microbiology Press, pp.

5. **Mackay IM**, (2007), Real-time PCR in microbiology, Caister Academic Press Norfolk, UK, pp.
6. **Roux KH**, (2009), "Optimization and troubleshooting in PCR." Cold Spring Harbor Protocols, 2009(4), pdb. ip66.
7. **Basu C**, (2015), PCR primer design, Springer, pp.
8. **Adeyemi OO, Herod MR, Oladiji F, et al.**, (2017), "A multi-template multiplex PCR assay for hepatitis B virus and human β -globin." Journal of Medical Virology, 89(11), 1944-51.

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CAN THIỆP VỀ VST CỦA NVYT HỆ THỐNG BVXA NĂM 2024

Nguyễn Thị Bông¹ và cộng sự

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Nhiễm khuẩn bệnh viện (NKBV) là một trong những thách thức hiện nay đối với hệ thống y tế toàn cầu, gây tăng tỷ lệ mắc bệnh, tử vong và chi phí điều trị. Theo (WHO), VST là biện pháp phòng ngừa NKBV hiệu quả nhất, đơn giản, chi phí thấp và có thể thực hiện ở mọi tuyến y tế. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu trên thế giới và tại Việt Nam cho thấy tỷ lệ tuân thủ VST của NVYT vẫn ở mức thấp, chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố như nhận thức, thái độ, áp lực công việc, sự sẵn có của phương tiện VST và văn hóa an toàn người bệnh. Xuất phát từ những lý do nêu trên, nghiên cứu này được tiến hành nhằm khảo sát đánh giá thực trạng tuân thủ vệ sinh tay của nhân viên y tế, phân tích các yếu tố liên quan đến tuân thủ, và đề xuất các biện pháp can thiệp để cải thiện trong bối cảnh kiểm soát nhiễm khuẩn tại hệ thống bệnh viện Xuyên Á năm 2024. Việc đánh giá hiệu quả của các biện pháp can thiệp có ý nghĩa quan trọng để đo lường sự cải thiện, và xác định các yếu tố liên quan để hướng đến việc vệ sinh tay của NVYT. **Mục tiêu:** Đánh giá tỷ lệ tuân thủ VST của NVYT trước và sau can thiệp trong hệ thống BVXA. **Đối tượng:** NVYT chăm sóc người bệnh tại khoa lâm sàng trong thời gian khảo sát. **Phương pháp:** Giám sát tuân thủ 5 thời điểm rửa tay theo khuyến cáo của WHO được triển khai tại các khoa trong hệ thống BVXA từ năm 2023 đến ngày 30 tháng 6 năm 2024. **Kết quả:** qua 42.325 cơ hội quan sát sự tuân thủ VST của NVYT khi thăm khám và chăm sóc cho người bệnh trong BVXA. Trong đó sự tuân thủ VST chung của NVYT trong hệ thống 78,73% tăng so với năm 2023. Trong hệ thống qua quan sát cho thấy sự tuân thủ VST của NVYT tại BVXA TP.HCM từ 79,73% lên 85,63% và BVXA Long An sự tuân thủ VST tăng từ 77,82% lên 78,31%. BVXA Vĩnh Long có tỷ lệ tuân thủ tăng từ 77,64% lên 79,70% và Tây Ninh nhận thấy tỷ lệ tuân thủ có xu hướng giảm so với năm 2023. Sự tuân thủ VST của NVYT thực hiện đúng quy trình đầy đủ 6 bước khi VST 62,33% tăng gần 1% trong hệ thống. **Kết luận:** tỷ lệ tuân thủ VST của NVYT khi thực hiện thăm khám chăm sóc cho người bệnh có xu hướng tăng dần mặc dù tỷ lệ tuân thủ chưa cao. Trong đó cũng cho thấy sự

tuân thủ của NVYT BVXA Vĩnh Long, Tây Ninh, Long An có tỷ lệ tuân thủ VST giảm so với trước can thiệp. **Từ khóa:** Rửa tay, nhân viên y tế, rửa tay thường quy, sát khuẩn tay nhanh, nhiễm khuẩn bệnh viện.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF HAND HYGIENE INTERVENTIONS FOR MEDICAL STAFF IN THE XUYEN A HOSPITAL SYSTEM IN 2024

Rationale: Hospital-acquired infections (HAIs) are one of the most serious challenges facing the global health system, causing increased morbidity, mortality and treatment costs. According to the World Health Organization (WHO), hand hygiene is the most effective, simple, low-cost and feasible measure to prevent HAIs at all levels of health care. However, many studies worldwide and in Vietnam show that the rate of compliance with hand hygiene among health care workers remains low, influenced by factors such as awareness, attitude, work pressure, availability of hand hygiene facilities and patient safety culture. Based on the above reasons, this study was conducted to survey and evaluate the current status of hand hygiene compliance of healthcare workers, analyze factors related to compliance, and propose interventions to improve in the context of infection control at the Xuyen A hospital system in 2024. Evaluating the effectiveness of interventions is important to measure improvement, and identify factors related to hand hygiene of healthcare workers. **Objectives:** Evaluation of hand hygiene compliance rate of healthcare workers before and after intervention in Xuyen A hospital system. **Subjects:** Medical staff caring for patients in the clinical department during the survey period. **Methods:** Monitoring compliance with the 5 handwashing moments recommended by WHO will be implemented in departments within the Xuyen A Hospital system from 2023 to June 30, 2024. **Results:** Through 42,325 opportunities to observe the compliance with hygiene standards of medical staff when examining and caring for patients in the XA Hospital. In which, the general compliance with hygiene standards of medical staff in the system is 78.73%, an increase compared to 2023. In the system, through observation, the compliance with hygiene standards of medical staff at the XA Hospital in Ho Chi Minh City increased from 79.73% to 85.63% and the compliance with hygiene standards of Long An BVXA increased

¹Bệnh viện Đa khoa Xuyên Á

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Bông

Email: bongksnk2017@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.9.2025

Ngày phản biện khoa học: 22.10.2025

Ngày duyệt bài: 26.11.2025