

## PHÂN LẬP VÀ NHẬN DẠNG MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN *STREPTOCOCCUS MUTANS* TỪ NGƯỜI VIỆT NAM

Nguyễn Quang Huy, Phùng Thị Thu Hường, Phan Tuấn Nghĩa

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, Hà Nội

### TÓM TẮT

Sâu răng là một trong những bệnh phổ biến nhất hiện nay, đặc biệt là ở những nước đang phát triển trong đó có Việt Nam. *Streptococcus mutans* được xem là một trong những nguyên nhân chính gây sâu răng bởi khả năng sinh acid và chịu acid tốt của chúng. Từ các mẫu lấy từ người Việt nam, bằng việc nuôi cấy trên môi trường chọn lọc Mitis salivarius, môi trường Tryptic soy agar (TSA) ở pH 5 cũng như đặc điểm hình thái tế bào kết hợp với việc sử dụng và kit thử API 20 Strep chúng tôi đã phân lập, xác định được 6 loài thuộc chi *Streptococcus* và được ký hiệu lần lượt là *Streptococcus* sp. H1, *Streptococcus* sp. H2, *Streptococcus* sp. H3, *Streptococcus* sp. H4, *Streptococcus* sp. H5 và *Streptococcus* sp. H6. Kết quả phân tích phổ băng DNA sau khi nhân bản bằng PCR của đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA, sau đó cắt bằng enzyme *Hae*III và *Hpa*II (kỹ thuật PCR - RFLP) cho thấy phổ băng của 3 chủng *Streptococcus* sp.H1, *Streptococcus* sp. H2 và *Streptococcus* sp. H3 hoàn toàn tương đồng với phổ băng của chủng *S. mutans* GS-5 chuẩn và khác với *S. sanguis* NCTC10904. Tương tự, sử dụng phương pháp PCR với cặp mồi của gen dextranase đặc hiệu của *S. mutans* của cả 3 chủng trên đều cho một băng duy nhất với kích thước 1,3 kb như chủng chuẩn. Các kết quả thu được cho phép khẳng định 3 chủng *Streptococcus* sp.H1, *Streptococcus* sp. H2 và *Streptococcus* sp. H3 là thuộc loài *Sretococcus mutans*. Bảng thí nghiệm làm giảm pH và giết chết bằng acid, cả 3 vi khuẩn *S. mutans* được phân lập đều chứng tỏ có khả năng sinh acid và chịu acid tốt, tương tự như chủng *S. mutans* GS-5 chuẩn.

**Từ khóa:** *Streptococcus mutans*, PCR-RFLP, gen dextranase, Mitis salivarius, 16S rRNA

### MỞ ĐẦU

Tập đoàn vi sinh vật trên mảng bám răng rất phong phú với hơn 500 loài đã được xác định trong đó *Streptococcus mutans* được xem là tác nhân chính gây sâu răng ở người. *Streptococcus mutans* là chủng vi khuẩn Gram dương có khả năng bám dính trên bề mặt răng sinh acid và chịu acid cao, chúng thường xuyên được phân lập từ mảng bám răng nơi chúng tổng hợp polysaccharide ngoại bào (Hamada, Slade, 1980; Belli *et al.*, 1995). Việc phát hiện, nhận dạng sớm sự có mặt của *S. mutans* sẽ góp phần trong việc điều trị và phòng trừ bệnh sâu răng ở người.

Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về phân lập, định loại các chủng *S. mutans* ở người dựa trên các phương pháp khác nhau như đặc điểm hình thái khuẩn lạc (Holt *et al.*, 1994), đặc điểm sinh lý sinh hóa trên các môi trường chọn lọc (Gold *et al.*, 1973) và gần đây là các kỹ thuật sinh học phân tử (Igarashi *et al.*, 1996; Oho *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 1997; 2003). Ở Việt Nam, hiện nay các nghiên cứu về *S. mutans* mới chỉ dừng lại là các nghiên cứu ban đầu về sự có mặt của chủng vi khuẩn này trong thành

phần trên mảng bám răng, hay dịch lợi của người Việt Nam (Đỗ Quang Trung *et al.*, 1999; Nguyễn Thị Mai Phương *et al.*, 2003).

Nghiên cứu của chúng tôi nhằm góp phần tìm hiểu, nhận dạng *Streptococcus mutans* phân lập ở người Việt Nam bằng các phương pháp phân tích hình thái, hóa sinh cũng như sinh học phân tử và xác định một số đặc trưng của chúng.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu

Các mẫu vi sinh vật được lấy bằng tăm bông vô trùng từ các ổ răng bị sâu răng các bệnh nhân bị sâu răng ở Khoa Răng Hàm Mặt, Bệnh viện Bạch Mai, sau đó được chuyển vào môi trường muối sinh lý 0,9% để phân lập tiếp.

Chủng *Streptococcus mutans* GS-5 và *Streptococcus sanguis* NCTC 10904 là quà tặng của Giáo sư Robert E. Marquis (Đại học Rochester, Mỹ).

Các oligonucleotide, các thang chuẩn DNA được

mua từ hãng Invitrogen (Mỹ), các dNTP của hãng Promega (Mỹ), các enzyme hạn chế của hãng New England Biolabs (NEB), môi trường Mitis salivarius và Tryptic Soy Agar (TSA) của hãng Difco (Mỹ), kit thử API20 Strep của hãng Bio Mérieux, Marcy-Ietoile (Pháp). Các hóa chất khác đều đạt độ tinh khiết dùng cho nghiên cứu sinh học phân tử.

## Phương pháp nghiên cứu

### Phương pháp phân lập chủng vi khuẩn

Mẫu thu thập được cấy trải trên môi trường chọn lọc Mitis salivarius có bổ sung tellurite 1% ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 ngày. Các khuẩn lạc sau khi mọc trên môi trường Mitis salivarius sau đó được cấy chuyển sang môi trường TSA ở pH 5,0 với nhiệt độ 37°C. Hình thái từng khuẩn lạc được quan sát, mỗi khuẩn lạc được tách nuôi cấy riêng rẽ trên môi trường lỏng TYG (tryptone 3%, cao nấm men 0,5% và glucose 1%).

Hình thái tế bào của các chủng vi khuẩn được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi điện tử quét JSWL5410 với sự giúp đỡ của Viện 69.

Nghiên cứu một số đặc điểm hóa sinh được tiến hành theo kit thử API20 Strep và kết quả được xử lý theo phần mềm do hãng cung cấp.

### Tinh sạch, nhân bản gen mã hóa 16S rRNA bằng phương pháp PCR và kỹ thuật RFLP

DNA của hệ gen được tinh sạch theo phương pháp mô tả bởi Sambrook và Rusell (2001) được xác định hàm lượng qua độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm. Các mẫu DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, gel sau đó được nhuộm với ethidium bromide, soi dưới ánh sáng tử ngoại và chụp ảnh.

Cặp mồi sử dụng nhân bản gen mã hóa 16S rRNA bao gồm mồi xuôi 8UA (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC) và mồi ngược 1492R (5'-TAC GGG TAC CTT GTT ACG ACT T). Một phản ứng 25 µl bao gồm 100 ng DNA khuôn, 2,5 µl đệm 10× Taq DNA polymerase, 50 ng mỗi loại mồi xuôi và ngược, 25 mM dNTP, 0,5 đơn vị Taq. PCR được thực hiện theo chu trình: 15 phút ở 95°C để biến tính DNA thành hai sợi đơn, 35 chu kỳ lặp lại của các bước 94°C 1 phút để tách chuỗi, 60°C, 1 phút để gắn mồi và 72°C trong 1 phút 30 giây để kéo dài chuỗi. Hỗn hợp sản phẩm nhân lên được ủ tiếp 72°C trong 10 phút và sau đó giữ ở 4°C đến khi phân tích (Sato *et al.*, 2003).

Sản phẩm PCR sau khi được nhân lên, tinh sạch bằng kit của hãng Bioneer (Hàn Quốc). Đoạn gen mã hóa 16S rRNA được cắt bởi hai enzyme cắt hạn chế *HpaII* và *HaeIII*. Tiếp theo, được phân tách và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2%, nhuộm ethidium bromide, soi dưới ánh sáng tử ngoại và chụp ảnh.

### Nhân bản đoạn gen dextranase bằng phương pháp PCR

Đoạn gen dextranase được tiến hành nhân bản bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu SD1 (5'-TAT GCT GCT ATT GGA GGT TC)' và SD2 (5'-AAG GTT GAG CAA TTG AAT CG). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% nhuộm ethidium bromide quan sát dưới đèn UV và chụp ảnh (Sato *et al.*, 2003).

### Đánh giá khả năng sinh acid và chịu acid của các chủng *S. mutans*

Khả năng sinh acid của *S. mutans* được đánh giá bằng phương pháp làm giảm pH trong môi trường dư thừa glucose theo phương pháp mô tả trong Phan, Marquis (2006). Khả năng chịu acid của các chủng *S. mutans* được đánh giá qua mức độ sống sót của vi khuẩn ở pH 2,7 như được mô tả trong Phan và đồng tác giả (2000).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân lập và nhận dạng sơ bộ các chủng vi khuẩn từ mẫu bệnh phẩm sâu răng

Từ các mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân sâu răng chúng tôi đã tiến hành phân lập trên môi trường Mitis salivarius có bổ sung 1% tellurite, đây là môi trường chọn lọc dùng để phân lập các chủng thuộc chi *Streptococcus* và *Enterococcus* (Gold *et al.*, 1973). Dựa trên đặc điểm khuẩn lạc của *S. mutans* trên môi trường này có màu xanh nhạt, mờ đục, hơi lồi và lượn sóng chúng tôi đã phân lập và tách được 20 chủng vi khuẩn.

Trong số 20 chủng vi khuẩn được phân lập trên môi trường Mitis salivarius khi chuyển sang nuôi cấy trên môi trường TSA có pH thấp (pH 5) chỉ có 6 chủng vi khuẩn phát triển có mang các đặc điểm tương đồng giống chủng chuẩn *S. mutans* GS-5. Kết quả nhuộm Gram cho thấy cả 6 chủng đều là vi khuẩn Gram dương có dạng hình cầu xếp thành chuỗi, và các chủng đều giống nhau không có khả năng sinh catalase. Đặc biệt, khi quan sát dưới kính

hiển vi điện tử các chủng này đều có dạng liên cầu khuẩn (Hình 1). Theo Holt và đồng tác giả (1994), dựa vào đặc điểm trên 6 chủng vi khuẩn này có thể thuộc chi *Streptococcus* và chúng được ký hiệu từ *Streptococcus* sp. H1 đến *Streptococcus* sp. H6 .

Để tiếp tục nhận dạng 6 chủng vi khuẩn thuộc chi *Streptococcus* ở trên chúng tôi đã sử dụng kit thử API20 Strep dựa trên khả năng sử dụng các loại đường và hoạt động của các enzyme đặc trưng. Kết quả phân tích thu được (Bảng 1) cho thấy trong số 6 chủng vi khuẩn phân lập được chủng *Streptococcus* sp. H1 giống *S. mutans* với độ tin cậy là 99%, T = 0,9. Chủng *Streptococcus* sp. H1 so với chủng chuẩn *S. mutans* GS-5 chỉ có một sai khác duy nhất về khả năng đồng hóa inulin, 2 chủng vi khuẩn *Streptococcus* sp. H2 và *Streptococcus* sp. H3 có độ tin cậy tương đối thấp đều 55,3% với giá trị T bằng 0,75 có thể thuộc nhóm *S. equinus*. 3 chủng *Streptococcus* sp. H4, *Streptococcus* sp. H5 và *Streptococcus* sp. H6 có khả năng thuộc *S. sanguis*

với độ tin cậy là hơn 99,5% và với hệ số tương ứng T với các chủng là 0,88, 0,71 và 0,83. Như vậy, kết quả phân tích bằng kit API20 Strep khẳng định một lần nữa cả 6 chủng phân lập được đều thuộc chi *Streptococcus*.



Hình 1. Ảnh chụp hiển vi của chủng vi khuẩn *Streptococcus* sp. H1 (độ phóng đại 15000 lần).

**Bảng 1.** Một số đặc tính sinh lý của 6 chủng *Streptococcus* sp. phân lập từ bệnh phẩm sâu răng người Việt Nam.

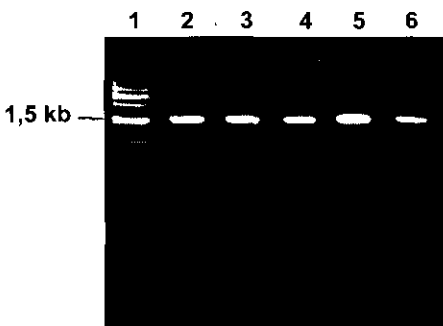
Đặc tính sinh hóa	<i>S. mutans</i> GS-5	<i>S. sp. H1</i>	<i>S. sp. H2</i>	<i>S. sp. H3</i>	<i>S. sp. H4</i>	<i>S. sp. H5</i>	<i>S. sp. H6</i>
Sinh acetoin	+	+	+	+	-	-	+
Thủy phân hippuric acid	-	-	-	-	-	-	-
Thủy phân $\beta$ -glucoside	+	+	+	+	+	+	+
Pyrrolidonyl arylamidase	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Galactosidase	+	+	+	+	-	-	-
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-
Alkaline phosphatase	-	-	-	-	-	-	+
Leucine amino peptidase	+	+	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	+	+	+
<b>Khả năng đồng hóa</b>							
D-ribose	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	+	+	-	-	-	-	-
D-mannitol	+	+	-	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	-	-	-	+	-
D-lactose	+	+	-	-	-	+	-
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	-
Inulin	+	-	-	-	+	+	-
D-raffinose	+	+	-	-	+	+	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-
Acid hóa Glycogen	-	-	-	-	-	-	-

**Nhận dạng các chủng vi khuẩn *Streptococcus mutans* phân lập ở người Việt Nam bằng kỹ thuật PCR phối hợp với kỹ thuật RFLP**

Ở vi khuẩn, trình tự của 16S rRNA có xấp xỉ 1500 nucleotide và có những vùng bảo thủ cao giữa tất cả các loài sinh vật. Do đó, các 16S rRNA là cơ sở phân tử chính xác để xác định mối quan hệ họ hàng và tiến hóa giữa các loài sinh vật nhân sơ (Sato et al., 1997), hay như cụ thể trên đối tượng *S. mutans* (Hamada, Slade 1980; Oho et al., 2000). Để tiếp tục xác định tên loài của chủng *Streptococcus* sp. H1, H2 và H3 chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật phân tích độ đa hình các đoạn phân cắt giới hạn (RFLP) của sản phẩm nhân bản đoạn gen 16S rRNA bằng PCR, kỹ thuật được gọi chung là PCR-RFLP. Đây là kỹ thuật sinh học phân tử để thực hiện để nhận dạng chính xác các loài *S. mutans* mà không cần sử dụng đến phương pháp giải trình tự gen (Sato et al., 2003).

Kết quả tách chiết DNA từ các chủng vi khuẩn, điện di trên gen agarose, đo tỷ số hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm (không trình bày ở đây) chứng tỏ các chế phẩm DNA tổng số thu được đều đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu tiếp theo.

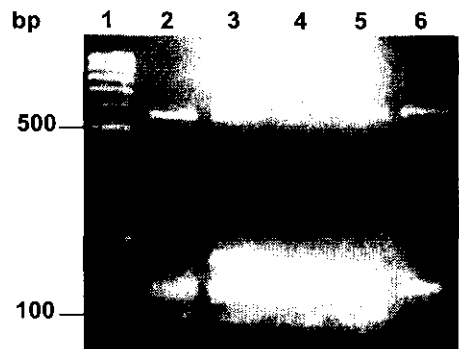
Kết quả kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy phản ứng PCR với cặp mồi 8UA và 1492R được thiết kế là rất đặc hiệu, chỉ một băng DNA nhân bản duy nhất có kích thước khoảng 1,5kb đúng như tính toán lý thuyết (Hình 2), cho phép chúng tôi kết luận là đã nhân bản thành công đoạn gen mã hóa cho 16S rRNA từ DNA hệ gen của các chủng vi khuẩn phân lập được.



Hình 2. Điện di trên gel agarose các sản phẩm PCR của các chủng vi khuẩn sau khi tinh sạch. 1: Thang chuẩn DNA 1 kb; 2: *S. mutans* GS5; 3: *S. sanguis* 10904; 4: *S. sp.* H1; 5: *S. sp.* H2; 6: *S. sp.* H3.

Sato và đồng tác giả (1997) đã phát triển phương

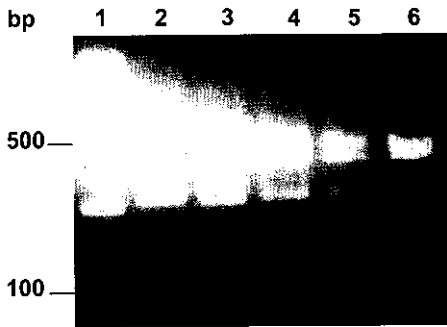
pháp nhận dạng các loài trong nhóm mutans streptococci bằng kỹ thuật đa hình độ dài các đoạn giới hạn RFLP bằng việc sử dụng hai enzyme cắt giới hạn *HpaII* và *HaeIII* đối với đoạn gen mã hóa 16S rRNA. Phương pháp này có thể giúp phân biệt được *S. mutans* và các chủng Streptococci khác (Sato et al., 2003). Các sản phẩm PCR của đoạn gen 16S rRNA từ các chủng vi khuẩn trên được tinh sạch và cắt bằng *HpaII* và *HaeIII*, sau đó được điện di trên gel agarose. Kết quả (Hình 3 và 4) cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn *Streptococcus* sp. H1, *Streptococcus* sp. H2 và *Streptococcus* sp. H3 đều cho phổ băng tương tự chủng chuẩn *S. mutans* GS-5. Cụ thể, khi được cắt bằng *HpaII*, cả 3 chủng *Streptococcus* sp. H1, *Streptococcus* sp. H2 và *Streptococcus* sp. H3 đều có 4 băng với kích thước lần lượt khoảng 120 bp, 130 bp, 300 bp và 500 bp, còn khi được cắt bằng *HaeIII* thì 3 chủng này cho 4 băng với kích thước lần lượt khoảng 120 bp, 300 bp, 400 bp và 500 bp. Phổ băng của cả 3 chủng khi cắt bằng 2 enzyme hoàn toàn giống như phổ băng của *S. mutans* GS-5 và cũng phù hợp sự có mặt của các trình tự nhân biết và phân cắt của hai enzyme này khi so sánh với trình tự gen mã hóa của 16S rRNA trong ngân hàng gen (Sato et al., 1997). Kết quả cũng còn cho thấy phổ băng của 3 chủng này khác so với phổ băng của chủng chuẩn *S. sanguis* NCTC 10904 (cũng thuộc chi *Streptococcus*).



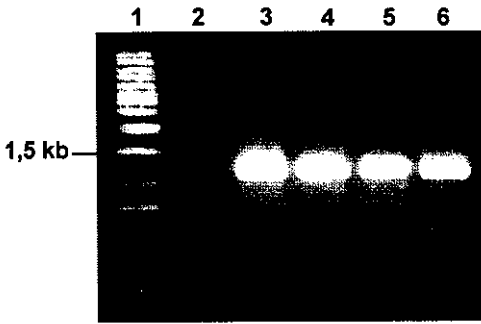
Hình 3. Điện di trên gel agarose 2% các sản phẩm PCR rRNA 16S sau khi cắt bằng *HpaII*. 1: Thang chuẩn DNA 1 kb; 2: *S. mutans* GS-5; 3: *S. sanguis* 10904; 4: *S. sp.* H1; 5: *S. sp.* H2; 6: *S. sp.* H3.

Để một lần nữa khẳng định chính xác các chủng *Streptococcus* sp. H1, H2 và H3 là *S. mutans* chúng tôi đã tiến hành PCR, sử dụng cặp mồi SD1 và SD2 được thiết kế dựa trên trình tự hai đầu của gen mã hóa dextranase đặc hiệu cho *S. mutans*. Theo tính

toán lý thuyết, với cặp mồi đặc hiệu SD1 và SD2 sản phẩm PCR của gen mã hóa dextranase các chủng *S. mutans* sẽ có kích thước là 1272 bp (Sato *et al.*, 2003). Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 5) cho thấy cả 3 chủng phân lập ở Việt Nam đều cho duy nhất một băng với kích thước khoảng 1,3 kb, tương tự băng DNA nhân bản thu được từ chủng chuẩn *S. mutans* GS-5. Trong khi đó chủng *S. sanguis* 10904 không cho băng nhân bản 1,3 kb này. Kết quả này một lần nữa cho phép chúng tôi khẳng định chính xác rằng cả 3 chủng *Streptococcus* sp. H1, H2 và H3 đều thuộc loài *S. mutans* và được ký hiệu lại tương ứng là *Streptococcus mutans* H1, *Streptococcus mutans* H2 và *Streptococcus mutans* H3.



Hình 4. Điện di trên gel agarose 2% sản phẩm PCR 16S rRNA sau khi cắt bằng *Hae*III. 1: Thang chuẩn DNA 1 kb; 2: *S. mutans* GS-5; 3: *S. sanguis* 10904; 4: *S. sp.* H1; 5: *S. sp.* H2; 6: *S. sp.* H3.

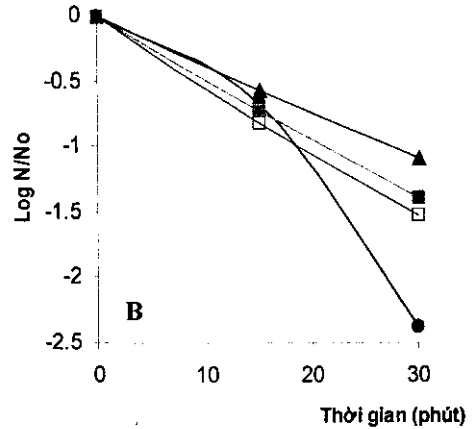
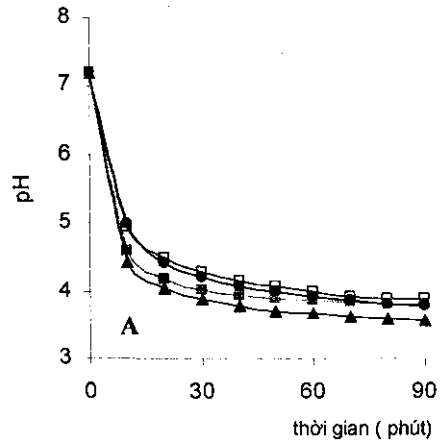


Hình 5. Điện di trên gel agarose 1% sản phẩm PCR gen dextranase của *S. mutans*. 1: Thang chuẩn DNA 1 kb; 2: *S. mutans* GS-5; 3: *S. sanguis* NCTC 10904; 4: *S. mutans* H1; 5: *S. mutans* H2; 6: *S. mutans* H3.

### Một số đặc điểm của 3 chủng vi khuẩn *S. mutans* H1, H2 và H3

Nhằm từng bước tìm hiểu khả năng gây sâu răng

của 3 chủng vi khuẩn *S. mutans* H1, H2 và H3 phân lập được ở người Việt Nam, chúng tôi đã phân tích khả năng sinh acid của chúng qua thí nghiệm làm giảm pH môi trường trong điều kiện dư thừa glucose và khả năng chịu hay bị giết chết bởi acid của chúng. Kết quả phân tích (Hình 6A) cho thấy cả 3 chủng *S. mutans* H1, H2 và H3 đều sinh acid mạnh, làm pH môi trường giảm xuống dưới 4, tương tự như chủng chuẩn *S. mutans* GS-5. Sau 90 phút giá trị pH cuối cùng trong môi trường của *S. mutans* GS-5 là 3,87 còn đối với *S. mutans* H1, H2 và H3 lần lượt là 3,78, 3,58 và 3,80. *S. mutans* H2 tỏ ra sinh acid mạnh nhất trong các chủng phân lập được thậm chí mạnh hơn so với *S. mutans* GS-5.



Hình 6. Khả năng sinh acid (A) và chịu acid (B) của các chủng *S. mutans* phân lập từ người Việt Nam. *S. mutans* GS-5 (□), *S. mutans* H1 (●), *S. mutans* H2 (▲), *S. mutans* H3 (■).

Kết quả thí nghiệm tìm hiểu khả năng bị giết chết ở pH 2,7 (Hình 6B) cho thấy thời gian để 90% tổng số vi khuẩn bị giết chết (giá trị  $\log N/N_0 = -1$ ) là

khoảng 20 phút đối với *S. mutans* GS-5 và *S. mutans* H1 còn đối với *S. mutans* H2 và H3 là khoảng 30 và 25 phút. Kết quả này chứng tỏ cả 3 chủng *S. mutans* H1, H2 và H3 phân lập từ người Việt Nam là những chủng vi khuẩn chịu acid tốt.

## KẾT LUẬN

Bằng các phương pháp phân tích hình thái, kết hợp với các phân tích hóa sinh và sinh học phân tử (PCR và PCR-RFLP) chúng tôi đã phân lập và xác định được 3 chủng *S. mutans* ở người Việt Nam. Các chủng *S. mutans* này đều thể hiện khả năng sinh acid và chịu acid tốt, những thuộc tính rất đặc trưng của vi khuẩn gây sâu răng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Belli WA, Buckley DH, Marquis RE (1995) Weak acid effects DNA fluoride inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Can J Microbiol* 41: 789-791.
- Đỗ Quang Trung, Lê Thị Oanh, Lê Hồng Thịnh (1999) Nhận xét bước đầu về vi khuẩn dịch lợi và mảng bám dịch lợi. *Tạp chí Y học Việt Nam* 10: 15-17.
- Gold OG, Jordan HV, van Houte J (1973) A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 18: 1357-1364.
- Hamada S, Slade HD (1980) Biology, immunology, DNA cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44: 331-384.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed, Williams & Wilkins: Baltimore, Maryland 20: 527-558.
- Igarashi T, Yamamoto A, Goto N (1996) Direct detection of *Streptococcus mutans* in human dental plaque by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 11: 294-298.
- Nguyễn Thị Mai Phương, Vũ Thị Minh Đức, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2003) Tìm hiểu thành phần vi khuẩn trên mảng bám răng của người Việt Nam. *Tạp chí Y học Việt Nam* 8: 11-17.
- Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T (2000) Simple DNA rapid detection of *Streptococcus mutans* and DNA *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 15: 258-262.
- Phan TN, Reidmiller JS, Marquis RE (2000) Sensitization of *Actinomyces neaslundii* DNA *Streptococcus sanguis* in dental plaques DNA suspensions to acid damage by fluoride DNA other weak acids. *Arch Microbiol* 174: 248-255.
- Phan TN, Marquis RE (2006) Triclosan inhibition of membrane enzymes of mutans streptococci. *Can J Microbiol* 52: 977-983.
- Sambrook J, Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sato T, Hu JP, Ohki K, Yamaura M, Washio J, Matsuyama J, Takahashi N (2003) Identification of mutans streptococci by restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S ribosomal RNA genes. *Oral Microbiol Immunol* 18: 323-326.
- Sato T, Sato M, Matsuyama J, Hoshino E (1997) PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes coding for 16S rRNA in *Veillonella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1268-1270.

## IDENTIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF *STREPTOCOCCUS MUTANS* ISOLATED FROM VIETNAMESE PATIENTS

Nguyen Quang Huy, Phung Thi Thu Huong, Phan Tuan Nghia\*

Hanoi University of Science, VNU

### SUMMARY

Dental caries is nowadays one of the most common diseases of the world, especially in developing countries including Vietnam. *Streptococcus mutans* is considered to be the main pathogen of dental caries because of their high acidogenicity and acidurance. From the samples collected from Vietnamese patients of dental caries, by using selective media of *Mitis salivarius* and tryptic soy agar at pH 5 and

\* Author for correspondence: Tel: 04. 5575494; Fax: 04. 8582769; E-mail: [phantn@fpt.vn](mailto:phantn@fpt.vn)

API20 Strep kit we isolated and identified 6 strains of *Streptococcus* which were designated as *Streptococcus* sp. H1, H2, H3, H4, H5 and H6. Three of the 6 strains were shown to have the same banding patterns of the PCR-amplified products of the gene coding for 16S rRNA, followed by restriction enzyme digestion with *Hae*III and *Hpa*II (PCR-RFLP) as *S. mutans* GS-5. Similarly, the three strains were also found to have the 1.3 kb band of dextranase of *Streptococcus mutans* by using PCR with dextranase-specific primers. The obtained results indicated that all the three isolated strains *Streptococcus* sp. H1, H2, H3 belong to *Streptococcus mutans*. By using pH drop and acid killing assays, all the three *S. mutans* strains were found to be as acidogenic and aciduric as *S. mutans* GS-5.

**Keywords:** *Dextranase gene, Mitis salivarius, PCR-RFLP, Streptococcus mutans, 16S rRNA*