

# Phân lập và lưu trữ vi khuẩn *Fusobacterium nucleatum* từ mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu

Trần Thị Phương Thảo\*, Đặng Thị Thắm và Trương Thành Hưng  
Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

## TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Phân lập và lưu trữ chủng vi khuẩn *Fusobacterium nucleatum* (Fn) từ mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu. **Phương pháp:** Mẫu thu thập được từ mẫu mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu giai đoạn III và IV có độ tuổi 18 - 65, vận chuyển và nuôi cấy trong môi trường chọn lọc, ủ 37°C trong điều kiện kỵ khí trong tối thiểu 3 ngày. Sau khi xác định gram, hình dáng và màu sắc đặc trưng, mẫu khuẩn lạc được gửi định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Thu thập mẫu cho tới khi nuôi cấy thành công vi khuẩn và lưu trữ ở nhiệt độ -80°C. **Kết quả:** Vi khuẩn Fn nuôi cấy thành công và kết quả giải trình tự khẳng định chủng vi khuẩn phân lập. **Kết luận:** Fn là vi khuẩn có vai trò quan trọng trong sinh bệnh học nha chu. Nuôi cấy và lưu trữ thành công vi khuẩn Fn từ mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu tạo nguồn vi khuẩn sẵn có, phục vụ cho các thí nghiệm nghiên cứu đa dạng trong y sinh học và nha khoa.

**Từ khóa:** vi khuẩn *Fusobacterium nucleatum* (Fn), mảng bám dưới nướu, giải trình tự Sanger

## 1. MỞ ĐẦU

Bệnh nha chu là trạng thái viêm mạn do vi khuẩn phá hủy các cấu trúc mô nha chu nâng đỡ bao gồm nướu, xương ổ răng, dây chằng nha chu và xê măng. Các bệnh lý này rất phổ biến ở người trưởng thành và gây mất răng ở các thể nặng nếu không được điều trị [1]. Theo bảng cập nhật của hệ thống phân loại bệnh lý nha chu đề xuất bởi Hiệp hội nha chu Hoa Kỳ (AAP: American Academy of Pediatrics) năm 2018, bệnh lý nha chu được chia thành hai nhóm chính là các bệnh lý nướu và viêm nha chu, phụ thuộc vào việc xảy ra sự phá hủy bám dính nha chu. Bệnh lý nha chu có rất nhiều yếu tố nguy cơ bao gồm hút thuốc lá và đái tháo đường, hơn nữa, nhiều vi khuẩn liên kết với nhau gây trầm trọng và tiến triển viêm nha chu nhiều hơn [2]. Viêm nướu và viêm nha chu mạn tính được khởi phát và tiến triển do các vi sinh vật ở mảng bám răng. Màng sinh học của vi khuẩn là đối tượng của rất nhiều nghiên cứu cho tới nay, và có tới 800 loài vi khuẩn khác

nau được nhận diện trong mảng bám răng ở người. Tuy nhiên, loài nào có độc tính và khởi phát bệnh vẫn còn là vấn đề tranh cãi [3].

Vi khuẩn *Fusobacteria* là trực khuẩn kỵ khí gram âm được tìm thấy trong miệng, đường tiêu hóa và các nơi khác trong cơ thể [4]. Trong đó, *Fusobacterium nucleatum* là một trong những loài có số lượng nhiều nhất trong khoang miệng, ở cả người bệnh và khỏe mạnh [5]. Nó có liên quan đến các dạng bệnh nha chu khác nhau bao gồm dạng viêm nướu nhẹ có thể hồi phục và các dạng viêm nha chu tiến triển không hồi phục bao gồm viêm nha chu mạn, viêm nha chu khu trú và viêm nha chu toàn thể. Nó cũng thường liên quan đến nhiễm trùng nội nha như hoại tử tủy và viêm quanh chóp [6]. Tỷ lệ nhiễm Fn tăng theo mức độ nặng của bệnh, sự tiến triển của viêm và độ sâu của túi. Trong số năm phân loài, *ss fusiforme* và *ss vincentii* thường tìm thấy ở người khỏe mạnh trong khi *ss nucleatum* liên quan với các dạng bệnh lý [7].

Tác giả liên hệ: ThS. Trần Thị Phương Thảo  
Email: thaotp@hiu.vn

Ngoài các vị trí nha chu, *Fn* còn được phát hiện trong nước bọt, với số lượng tăng lên ở những bệnh nhân bị viêm nướu và viêm nha chu, so với nhóm chứng khỏe mạnh [8]. Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh đối với *Fn* đã được báo cáo là tăng ở những bệnh nhân bị bệnh [9].

Bên cạnh là một vi khuẩn có vai trò độc lực cao góp phần gây ra các bệnh lý nha chu [10], y văn cũng chứng minh mối liên quan giữa sự hiện diện của *Fn* và các bệnh toàn thân khác như ung thư đại trực tràng, nhiễm trùng đầu và cổ (hội chứng Lemierre, viêm xương chũm cấp tính và mạn tính, viêm tai giữa mạn tính và viêm xoang, viêm amidan, áp xe phức mạc và hầu họng, viêm hạch cổ tử cung, viêm nha chu), não, phổi, bụng, xương chày, xương, khớp và máu [4].

Mặc dù trên thế giới, vi khuẩn *Fn* đã có quy trình phân lập và lưu trữ chủng vi khuẩn từ rất lâu, tuy nhiên tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu phân lập và lưu trữ vi khuẩn *Fn* để tạo nguồn vi khuẩn sẵn có, mà chủ yếu đặt mua ở nước ngoài, kéo dài thời gian chờ đợi khi thực hiện nghiên cứu so sánh, thử nghiệm các phương pháp chẩn đoán

và điều trị bệnh lý nha chu và các bệnh lý liên quan. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này không nhằm mục đích khảo sát tỷ lệ và các yếu tố ảnh hưởng tới nuôi cấy vi khuẩn *Fn*, mà chỉ nhằm mục đích phân lập được vi khuẩn *Fn* từ mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu, định danh bằng phương pháp giải trình tự, từ đó lưu trữ được chủng vi khuẩn để tạo nguồn sẵn có, nhanh chóng, để phục vụ cho các thử nghiệm y sinh liên quan tới vi khuẩn này.

## 2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Mẫu mảng bám dưới nướu của bệnh nhân viêm nha chu.

## 3. TIÊU CHUẨN CHỌN MẪU

Mẫu mảng bám dưới nướu được thu thập tại các túi nha chu sâu từ 6 mm trở lên của bệnh nhân được chẩn đoán viêm nha chu giai đoạn III và IV theo bảng phân loại mới các bệnh và tình trạng nha chu và quanh implant năm 2018 (Bảng 1) của Hiệp hội hàn lâm nha chu Hoa Kỳ [2], có độ tuổi từ 18 tới 65, tại khu điều trị, Khoa Răng Hàm Mặt, Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng.

**Bảng 1.** Phân loại các giai đoạn viêm nha chu theo AAP [2]

Tiêu chí		Giai đoạn I	Giai đoạn II	Giai đoạn III	Giai đoạn IV
Độ trầm trọng	Mất bám dính giữa hai răng tối đa	1 - 2 mm	3 - 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	Mất xương trên phim	< 15%	15 - 33%	Có thể tới 1/3 giữa chân răng và hơn	Có thể tới 1/3 giữa chân răng và hơn
	Răng mất vì lý do nha chu	0	0	≤ 4	≥ 5
Độ phức tạp	Độ sâu túi	≤ 4 mm	≤ 5 mm	≥ 6 mm	≥ 6 mm
	Mất xương trên phim	Chủ yếu theo chiều ngang	Chủ yếu theo chiều ngang	Chiều dọc ≥ 3 mm	Chiều dọc ≥ 3 mm
	Tổn thương chẻ	Không hoặc loại I	Không hoặc loại I	Loại II hoặc III	Loại II hoặc III
	Thiếu hồng mào xương	Không hoặc nhẹ	Không hoặc nhẹ	Trung bình	Nặng
	Cần điều trị phục hồi phức tạp*	Không	Không	Không	Có

\* Rối loạn chức năng nhai, chấn thương khớp cắn thứ phát (lưng lạy ≥ 2), mất kích thước dọc, còn lại < 20 răng (10 cặp răng đối nhau), v.v...

**Tiêu chuẩn loại trừ**

Mẫu mảng bám của các đối tượng sử dụng thuốc kháng sinh, kháng viêm, thuốc tránh thai trước khi tham gia nghiên cứu 6 tháng, có thói quen hút thuốc lá.

**4. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Nghiên cứu *in vitro*.

**Quy trình nghiên cứu**

Bước 1: Lấy mẫu nuôi cấy

Quy trình lấy mẫu được thực hiện theo phương pháp của Doan Nguyen và cộng sự (1999) [11].

- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy chọn lọc:

Môi trường để vận chuyển mẫu: 2 mL Wilkins Chalgren Anaerobic broth base (Oxoid - CM0643B) đã hấp vào ống eppendorf để vận chuyển. Môi trường nuôi cấy: Wilkins Chalgren Anaerobic broth base (Oxoid - CM0643B và Agar bacteriological - Oxoid LP0011B) có thành phần hemin và menadion. Sau khi hấp, bổ sung 5% máu cừu tách sợi (Công ty Nam Khoa), erythromycine (Oxoid) 4 µg/mL và crytal violet (Oxoid) 5 µg/mL [12]. Đổ 15 mL môi trường vào từng đĩa petri, lưu trữ.

- Lấy mẫu vi khuẩn: Bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn chọn vào được thực hiện làm sạch vôi răng, mảng bám trên nướu. Cô lập vùng răng lấy mẫu bằng gòn cuộn, sử dụng 2 - 4 côn giấy vô trùng kích thước 35 - 40 mm đưa vào các túi nha chu từ 5 mm trở lên, giữ trong 30 giây, và chuyển vào các ống eppendorf chứa môi trường vận chuyển, đưa vào túi chứa gói hút oxy và vận chuyển về phòng thí nghiệm (Hình 1).

Bước 2: Nuôi cấy và định danh

- Vortex eppendorf chứa mẫu trong 45 giây, phần huyền phù vi khuẩn được pha loãng bậc 10 trong dung dịch vận chuyển, sử dụng que trải cấy dung dịch mẫu vào đĩa thạch. Ủ ở 37°C từ 3 - 5 ngày trong môi trường kỵ khí (80 - 90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 5 - 10% CO<sub>2</sub>) sử dụng bình Gaspak (Merk-Đức) với túi tạo môi trường kỵ khí AnaeroPack (Mitsubishi, Nhật Bản) [13].

- Khuẩn lạc có kiểu hình và màu sắc đặc trưng được cấy chuyền, làm thuần, định danh bằng phương pháp giải trình tự. Quy trình giải trình tự Sanger được thực hiện bởi hãng First Base (Malaysia) bằng máy ABI Genetic Analyzers 3730 XL. Sau quá trình chạy PCR thu được 25 µl, 1 µl sử dụng điện di, còn lại gửi giải trình tự với đoạn mồi đặc hiệu.

Bước 3: Lưu trữ vi khuẩn

- Chủng vi khuẩn sau khi định danh được lưu trữ trong môi trường chứa glycerol ở điều kiện âm sâu trong nitơ lỏng.

- Để đánh giá sự ổn định của chủng lưu trữ, chủng vi khuẩn được hoạt hóa và cấy chuyền mỗi nửa tháng. Chủng được cho là có khả năng tăng sinh và phục hồi khi chủng nuôi cấy có thể phát triển được trên bề mặt thạch sau nhiều lần cấy chuyền.

Tất cả các bệnh nhân đều được giải thích về nghiên cứu và chấp thuận tham gia nghiên cứu. Đề cương nghiên cứu đã thông qua Hội đồng Y đức của Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng.

**5. KẾT QUẢ**

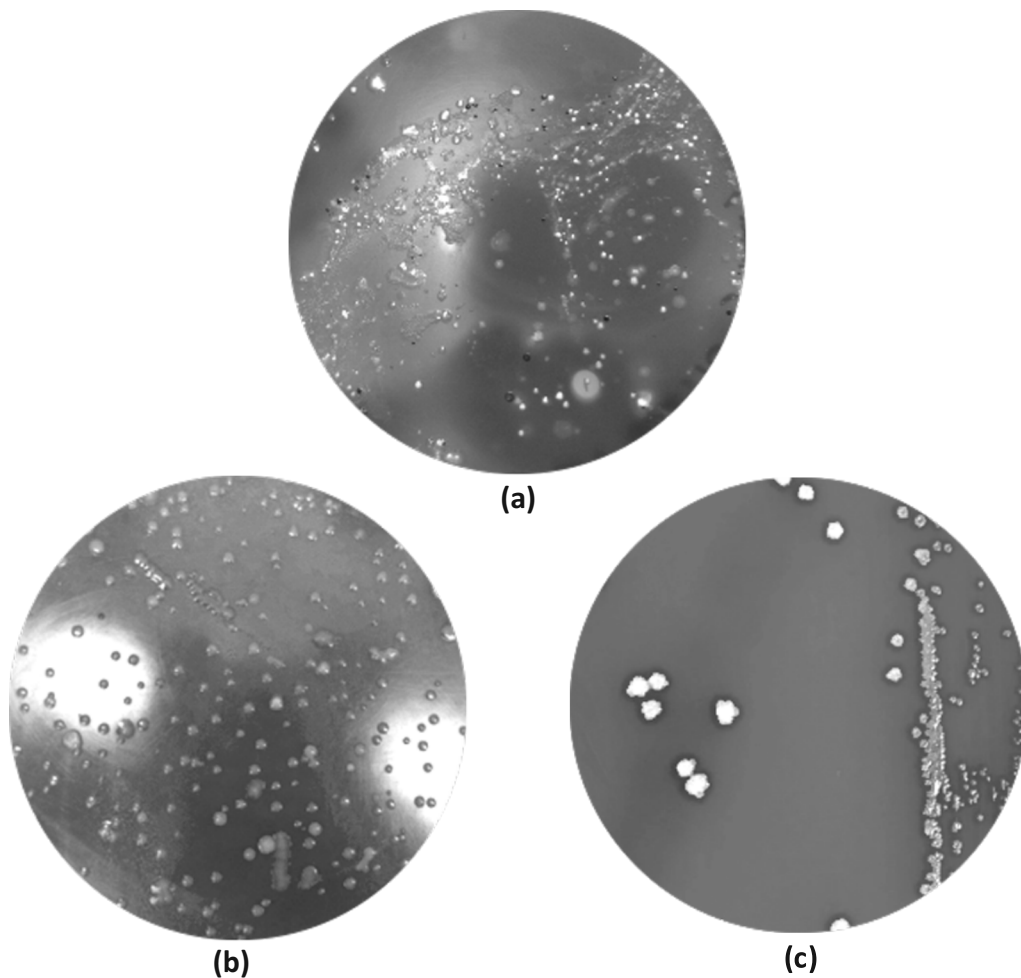
Trong số 39 mẫu mảng bám của 15 bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn lựa chọn, chúng tôi nuôi cấy được 2 mẫu vi khuẩn có hình thái và đặc điểm của *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*). Các vi khuẩn này thường xuất hiện cùng với vi khuẩn *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) - có khuẩn lạc tạo màu đen trên đĩa thạch máu. Khuẩn lạc *Fn* có dạng hình tròn hoặc không đều với mép hình thoi, kích thước từ 1 - 2 mm lõm đốm màu xám hoặc trắng xanh, trong suốt (Hình 2). Vi khuẩn được làm thuần, gửi định danh bằng phương pháp giải trình tự Sanger thực hiện bởi hãng First Base (Malaysia) bằng máy ABI Genetic Analyzers 3730 XL, thang đo HyperLadder™ 100bp với đoạn mồi đặc hiệu: Forward primer 5'-CAA CCA TTA CTT TAA CTC TAC CAT GTT CA-3'; Reverse primer 5' GTT GAC TTT ACA GAA

GGA GAT TAT GTA AAA ATC-3' [14]. So sánh kết quả giải trình tự thu được với công cụ tìm kiếm các trình tự tương đồng (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) khẳng định chủng phân lập thuộc loài *Fusobacterium*

*nucleatum* (Hình 3). Tuy nhiên, mẫu vi khuẩn thứ nhất cho kết quả tương đồng chỉ 87.7% khi so sánh với ngân hàng gen, mẫu vi khuẩn thứ hai có kết quả tương đồng lớn hơn và là đối tượng lưu trữ.



**Hình 1.** Lấy mẫu mảng bám dưới nướu và đưa vào ống chứa môi trường vận chuyển, pha loãng dung dịch chứa mẫu



**Hình 2.** Hệ vi khuẩn nuôi cấy được từ mảng bám dưới nướu (a), các mẫu khuẩn lạc có đặc điểm với *Fn* theo y văn được làm thuần (b, c)

**6. BÀN LUẬN**

*Fn* là một trong những loài vi khuẩn phổ biến nhất tồn tại trong khe nướu; mức độ phổ biến của nó tăng lên theo mức độ nghiêm trọng của bệnh lý nha chu và sự tiến triển tình trạng viêm. *Fn* đóng vai trò như một cầu nối thực sự, kết nối các khuẩn lạc ban đầu với các vi khuẩn xâm nhập muộn hơn, do đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc hình thành màng sinh học vững chắc [15]. *Fn* thuộc họ Fusobacteriaceae và bao gồm năm loài phụ (ss): *ss animalis*, *ss fusiforme*, *ss nucleatum*, *ss poly-morphum* và *ss vincentii*. *Fn* sở hữu một số yếu tố độc lực, bao gồm chất kết dính (tạo điều kiện thuận lợi cho sự kết dính và xâm nhập vào các loại tế bào khác nhau, dẫn đến

sự tập hợp, phân tán và kích hoạt các phản ứng miễn dịch của vật chủ), nội độc tố, và tiết ra protease serine (chịu trách nhiệm ngăn chặn nhu cầu dinh dưỡng của các vi sinh vật miệng khác [10]. Y văn cũng ghi nhận vai trò của *Fn* không chỉ là yếu tố bệnh nguyên nha chu, mà còn liên quan tới các bệnh lý nhiễm khuẩn khác ở người như rối loạn hệ tiêu hóa, bệnh lý tim mạch, bệnh lý khớp, hô hấp, hội chứng Lemierre và bệnh Alzheimer [9] và trong phát triển một số loại ung thư [4]. Đó là lý do vì sao *Fn* là đối tượng của nhiều nghiên cứu về cơ chế sinh bệnh học, mối liên hệ giữa sức khỏe răng miệng và các bệnh lý khác nhau ở cơ thể người, cũng như tác dụng của các phương pháp điều trị [16, 17].



Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 38 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 387N_16837	uncultured Fusobacterium sp.	281	281	42%	1e-74	87.70%	1132	LT691520.1
Fusobacterium sp. oral clone ASCF11 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	Fusobacterium sp. oral clone ASCF11	279	279	41%	4e-74	88.14%	1558	AY953256.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate W725N_2175	uncultured Fusobacterium sp.	276	276	36%	5e-73	90.48%	969	LT676781.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 182N_6911	uncultured Fusobacterium sp.	257	257	42%	2e-67	86.01%	641	LT681497.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 387N_16882	uncultured Fusobacterium sp.	250	250	34%	3e-65	89.80%	1120	LT691465.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 392N_8782	uncultured Fusobacterium sp.	248	248	36%	1e-64	88.10%	965	LT683367.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 459N_15202	uncultured Fusobacterium sp.	204	204	30%	2e-51	88.30%	757	LT689786.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 179T_23729	uncultured Fusobacterium sp.	202	202	35%	9e-51	84.65%	862	LT688311.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 170T_7446	uncultured Fusobacterium sp.	196	196	36%	4e-49	84.69%	820	LT682032.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate D3T_15512	uncultured Fusobacterium sp.	189	189	38%	7e-47	82.35%	763	LT690096.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate D3T_15496	uncultured Fusobacterium sp.	189	189	38%	7e-47	82.35%	763	LT690080.1
Uncultured Fusobacterium sp. partial 16S rRNA gene, isolate 407T_13718	uncultured Fusobacterium sp.	178	178	27%	1e-43	87.74%	724	LT688303.1

(a)

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

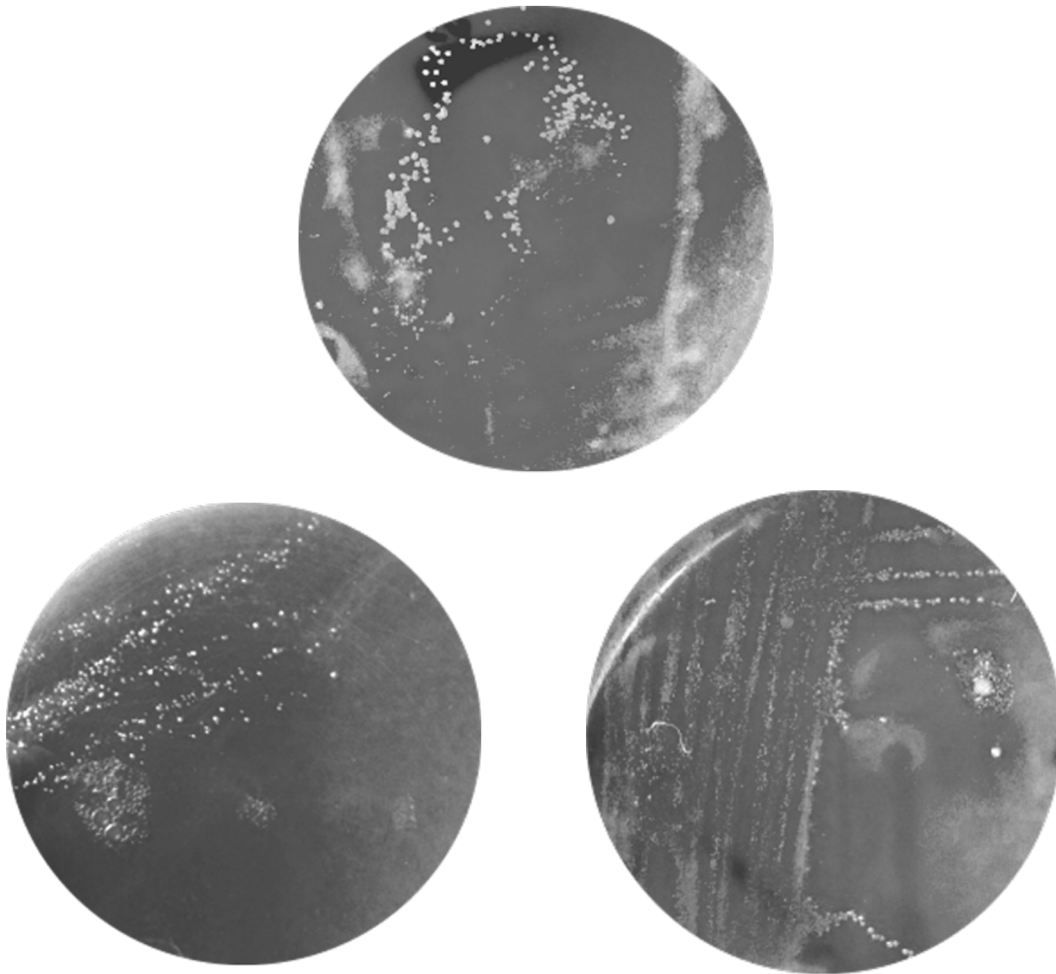
Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum strain KCOM 2510 (= ChDC F246) 16S ribosomal RNA gene...	Fusobacterium...	542	768	99%	1e-149	100.00%	1428	MW559489.1
Uncultured organism clone ELU0144-T169-S-IIPCRAMgAn_000011 small subunit ribosomal RNA gene...	uncultured orga...	542	768	99%	1e-149	100.00%	1414	HQ799328.1
Uncultured bacterium clone ncd1603e08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bact...	542	768	99%	1e-149	100.00%	1326	JF138380.1
Fusobacterium nucleatum strain UC01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1410	MK838562.1
Fusobacterium nucleatum strain Fn12230 chromosome, complete genome	Fusobacterium...	536	3787	99%	5e-148	99.66%	2421837	CP053488.1
Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum strain KCOM 3210 (=JS17) 16S ribosomal RNA gene, par...	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1428	MT436835.1
Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum strain KCOM 3036 (=JS17) 16S ribosomal RNA gene, par...	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1428	MT269314.1
Fusobacterium nucleatum strain GS17A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1347	MN988852.1
Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum strain ChDC F288 (= KCOM 1265) 16S ribosomal RNA gene...	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1428	MK788222.1
Fusobacterium sp. strain ChDC F299 (KCOM 2555) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Fusobacterium...	536	757	99%	5e-148	99.66%	1428	MK544008.1
Fusobacterium pseudoperiodonticum strain KCOM 2653 chromosome, complete genome	Fusobacterium...	536	3776	99%	5e-148	99.66%	2291059	CP024705.1
Fusobacterium pseudoperiodonticum strain KCOM 2555 chromosome, complete genome	Fusobacterium...	536	3765	99%	5e-148	99.66%	2477385	CP024704.1
Fusobacterium pseudoperiodonticum strain KCOM 2305 chromosome, complete genome	Fusobacterium...	536	3787	99%	5e-148	99.66%	2273832	CP024703.1

(b)

**Hình 3.** Hình ảnh điện di trên gel agarose (trái) với M: DNA molecular weight maker (HyperLadder™) 100bp và so sánh kết quả giải trình tự trên BLAST (phải), mẫu vi khuẩn (b) có tỷ lệ tương đồng cao với *Fn*



**Hình 4.** Vi khuẩn *Fn* vẫn tăng sinh sau nhiều lần cấy chuyển

Theo Han [17], *Fn* là một loài kỵ khí khó tính, việc nuôi cấy *Fn* rất khó khăn. Do đó, mặc dù có thể nuôi cấy được, *Fn* thường bị bỏ qua trong quy trình nuôi cấy thông thường ở phòng thí nghiệm bệnh viện. Những phát hiện gần đây về sự kết hợp gây bệnh cơ hội trong các bệnh lý khác ngoài bệnh nha chu phần lớn là do việc sử dụng các phương pháp không phụ thuộc vào nuôi cấy [17]. Bên cạnh đó, mặc dù tỷ lệ phát hiện vi khuẩn *Fn* thông qua các phương pháp phân tử và hóa mô miễn dịch cao, nhưng điều này không tương ứng với tỷ lệ nuôi cấy thành công vi khuẩn này và bị tác động bởi nhiều yếu tố [17]. Nếu việc phát hiện và định lượng vi khuẩn *Fn* đã dần được thay thế bằng các phương pháp hiện đại như PCR, nuôi cấy vi

khuẩn vẫn giữ vai trò thiết yếu trong việc cung cấp nguồn vi khuẩn để thực hiện các nghiên cứu so sánh tỷ lệ vi khuẩn ở mẫu bệnh nhân viêm nha chu so với bệnh nhân khỏe mạnh [18], về phương pháp nuôi cấy [9] hay hoạt chất điều trị [16], các thử nghiệm về đặc điểm miễn dịch và tính chất enzyme [17]. So với các vi khuẩn hiếu khí, các vi khuẩn kỵ khí bắt buộc như *Fn* đòi hỏi thời gian nuôi cấy dài hơn, và môi trường nuôi cấy không có oxy ở nhiệt độ tối ưu (35 - 37°C). Theo y văn, các chủng vi khuẩn *Fn* có thời gian nuôi cấy, thay đổi từ 2 - 14 ngày [19 - 21]. Do thiếu superoxide dismutase và catalase, *Fn* bắt buộc không có mặt oxy để phát triển, do đó, sử dụng các hệ thống bình ủ và túi tạo môi trường kỵ khí đã được đề xuất nhằm hỗ trợ việc sinh

trưởng của các vi khuẩn này [11, 12]. Trong quá trình nuôi cấy, nhóm nghiên cứu ghi nhận sự có mặt tương đồng giữa *Fn* và *Pg* trong các mẫu khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc. Điều này cũng tương đồng với một số nghiên cứu về mối quan hệ tương hỗ giữa *Fn* và *Pg* khi các tác giả đề xuất *Fn* có vai trò kích thích sự sinh trưởng, độc lực của *Pg* trong màng sinh học [18, 22], tạo ra môi trường giàu cacbon dioxid cho sự phát triển của *Pg*, có thể kết tụ không chỉ với cả các loài chịu oxy và các loài kỵ khí bắt buộc khác mà còn với các cặp loài kỵ khí bắt buộc không kết hợp với oxy [23].

Trong nghiên cứu của chúng tôi, với 39 mẫu mảng bám của bệnh nhân thỏa tiêu chí chọn mẫu, chỉ nuôi cấy được 2 mẫu vi khuẩn có đặc điểm tương đồng với *Fn* trong y văn về đặc điểm hình thái, sinh hóa (10.5%). Tỷ lệ này tương đồng với nghiên cứu của Doan và cs (9.76%) [11] có sự khác biệt với nghiên cứu của Kotsilkov K (2015) với 0% [24], Gajardo (2005) với 41.2% [25]. Sự tương đồng và khác biệt này chủ yếu do số lượng mẫu thu thập và phương pháp nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng quy trình lấy mẫu và hệ thống ủ kỵ khí GasPak tương tự như của Doan và cs (1999) [11]. Loesche [26] đã chứng minh rằng các loài kỵ khí khó tính trong miệng không có khả năng phát triển ở mức oxy hơn 0.5%. Ngay cả khi việc tiếp xúc với oxy trong thời gian ngắn có thể không tiêu diệt được vi khuẩn kỵ khí ở miệng, các hệ thống nuôi cấy kỵ khí nhằm mục đích đạt

được tình trạng không có oxy càng sớm càng tốt sau khi xử lý mẫu. Trong điều kiện xử lý một số lượng mẫu hạn chế, hệ thống Gaspak được chứng minh hiệu quả trong việc phân lập các bệnh nguyên nha chu. Các vi khuẩn trong nhóm phân loại vi khuẩn *Fusobacteria* có quan hệ rất chặt chẽ với nhau và tương đối khó khăn để phân biệt bằng nuôi cấy thông thường [17, 19]. Có lẽ vì lý do này, trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ một trong hai mẫu gửi giải trình tự cho kết quả khẳng định là *Fusobacterium nucleatum* với độ tương đồng cao, mẫu còn lại chỉ thuộc loài *Fusobacterium spp.* Để chứng phân lập trở thành đối tượng cho các nghiên cứu về cơ chế độc lực hoặc tính kháng khuẩn của chế phẩm y sinh thì chủng phân lập phải tăng sinh bình thường sau thời gian được lưu trữ. Kết quả lưu trữ và tăng sinh chủng *Fn* theo thời gian đã cho thấy đến thời điểm hiện tại, chủng này đã được hoạt hóa và cấy chuyển sau 9 tháng (mỗi nửa tháng 1 lần), kết quả cấy chuyển F1, F2, F3 vẫn phát triển bình thường.

## 7. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập và lưu trữ thành công chủng vi khuẩn *Fusobacterium nucleatum* từ mảng bám dưới nướu của bệnh nhân có bệnh nha chu tại Việt Nam. Nghiên cứu góp phần tạo nguồn vi khuẩn sẵn có phục vụ cho các mục tiêu nghiên cứu về nha chu học và nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chế phẩm sinh học mới.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.G Newman, H. H Takei, P. R Klokkevold and F. A Carranza, *Newman and Carranza's clinical periodontology*, 13th edition, Philadelphia, PA : Elsevier, 2019
- [2] J.G. Caton, G. Armitage, T. Berglundh, ... and M.S. Tonetti, "A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and

conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification", *Journal of Clinical Periodontology*, Vol 45, S20, pp.S1 - S8, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12935

- [3] D.F. Kinane, P.G Stathopoulou and P.N Papapanou, "Periodontal diseases", *Nature*

- Reviews Disease Primers*, 3, 17038, 2017. DOI: 10.1038/nrdp.2017.38
- [4] C.A. Brennan and W.S. Garrett, "Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium", *Nature reviews Microbiology*, Vol 17, 3, pp.156-166, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0129-6
- [5] C.A. Field, M.D. Gidley, P.M. Preshaw and N. Jakubovics, "Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes", *Journal of Periodontal Research*, Vol 47, 4, pp.470 - 478, 2012. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x
- [6] A.C. Didilescu, D. Rusu, A. Anghel,... and S.I. Stratul, "Investigation of six selected bacterial species in endo-periodontal lesions", *International Endodontic Journal*, Vol 45, 3, pp.282-293, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2011.01974.x
- [7] J.W. Vincent, J.B. Suzuki, W.A. Falkler Jr, W.C. Cornett, "Reaction of human sera from juvenile periodontitis, rapidly progressive periodontitis, and adult periodontitis patients with selected periodontopathogens", *Journal of Periodontology*, Vol 56, 8, pp.464 - 469, 1985. DOI: 10.1902/jop.1985.56.8.464
- [8] X. Wang, C.S. Buhimschi, S. Temoin,... and I.A. Buhimschi, "Comparative microbial analysis of paired amniotic fluid and cord blood from pregnancies complicated by preterm birth and early-onset neonatal sepsis", *PLoS One*, Vol 8, 2, e56131, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0056131
- [9] Y.W. Han and X. Wang, "Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation", *Journal of Dental Research*, Vol 92, 6, pp.485 - 491, 2013. DOI: 10.1177/0022034513487559
- [10] K.Q. de Andrade, C.L.C Almeida-da-Silva and R. Coutinho-Silva, "Immunological Pathways Triggered by *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: Therapeutic Possibilities?", *Mediators of inflammation*, 2019:7241312, 2019. DOI: 10.1155/2019/7241312
- [11] N. Doan, A. Contreras, J. Flynn, J. Morrison and J. Slots, "Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 37, 1, pp.171 - 174, 1999. DOI: 10.1128/JCM.37.1.171-174.1999
- [12] C.B. Walker, D. Ratliff, D. Muller, R. Mandell and S.S. Socransky, "Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 10, 6, pp.844 - 849, 1979. DOI: 10.1128/jcm.10.6.844-849.1979
- [13] A.L. Leber, "Incubation Techniques for Anaerobic Bacteriology Specimens", in *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th edition, Washington DC: ASM Press, 2016, pp.441-444
- [14] X. Gu, L.J Song, L.X. Li, T. Liu, ... and X.L. Zuo, "*Fusobacterium nucleatum* Causes Microbial Dysbiosis and Exacerbates Visceral Hypersensitivity in a Colonization-Independent Manner", *Frontiers in microbiology*, Vol 11, 1281, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01281
- [15] P. Ortiz, N.F. Bissada, L. Palomo, ... and A. Askari, "Periodontal therapy reduces the severity of active rheumatoid arthritis in patients treated with or without tumor necrosis factor inhibitors", *Journal of Periodontology*, Vol 80, 4, pp.535-540, 2009. DOI: 10.1902/jop.2009.080447
- [16] L.C. Yang, S.W. Hu, M. Yan, ... and Y.Y. Lin, "Antimicrobial activity of platelet-rich plasma and other plasma preparations against periodontal pathogens", *Journal of Periodontology*, Vol 86, 2, pp.310-318, 2015. DOI: 10.1902/jop.2014.140373
- [17] Y.W. Han, "*Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. Current opinion in microbiology", *Current Opinion in Microbiology*, Vol 23, pp.141 - 147, 2015. DOI: 10.1016/j.mib.2014.11.013
- [18] A. Saito, S. Inagaki, R. Kimizuka, ... and K. Ishihara, "*Fusobacterium nucleatum* enhances invasion of human gingival epithelial and aortic



endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Vol 54, 3, pp.349 - 355, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00481.x.

[19] K. Boutaga, A.J. Winkelhoff, C.M. Vandembroucke-Grauls, and P.H. Savelkoul, "Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR", *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, Vol 45, 2, pp.191 - 199, 2005. DOI: 10.1016/j.femsim.2005.03.011

[20] S.R. Moraes, J.F. Siqueira Jr, A.P. Colombo, ... and R.M. Domingues, "Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-dNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections", *Journal of Endodontics*, Vol 28, 2, pp. 86 - 89, 2002. DOI: 10.1097/00004770-200202000-00009

[21] P.M. Jervøe-Storm, M. Koltzsch, W. Falk, A. Dörfler, and S.Jepsen, "Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples", *Journal of Clinical Periodontology*, Vol 32, 7, pp.778-783, 2005. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2005.00740.x

[22] T. Thurnheer, L. Karygianni, M. Flury, and G.N. Belibasakis, "Fusobacterium Species and Subspecies Differentially Affect the Composition

and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models", *Frontiers in microbiology*, Vol 10, 1716, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01716

[23] P.I. Diaz, P.S. Zilm, and A.H. Rogers, "Fusobacterium nucleatum supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments", *Microbiology (Reading)*, Vol 148, Pt 2, pp.467-472, 2002. DOI:10.1099/00221287-148-2-467

[24] K. Kotsilkov, C. Popova, L. Boyanova, L.Setchanova, and I. Mitov, "Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets", *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Vol 29, 5, pp.996-1002, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1058188

[25] M. Gajardo, N.Silva, L. Gómez León R, and J. Gamonal, "Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population", *Journal of Periodontology*, Vol 76, 2, pp.289-294, 2005. DOI: 10.1902/jop.2005.76.2.289

[26] W.J. Loesche, D.E. Lopatin, J. Stoll, N. van Poperin, and P. P. Hujoel, "Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard?", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 30, 2, pp.418-426, 1992. DOI: 10.1128/jcm.30.2.418-426.1992

## Isolation and storage of *Fusobacterium nucleatum* from the subgingival plaque of patients with periodontitis

Tran Thi Phuong Thao<sup>\*</sup>, Dang Thi Tham and Truong Thanh Hung

### ABSTRACT

*Objective: To isolate and store Fusobacterium nucleatum (Fn) from clinical subgingival plaques of periodontitis patients. Methods: Subgingival plaque samples collected from patients with periodontitis stade III and IV, aged 18 - 65, were used to recover Fn. After growing in selective media and anaerobic conditions in at least three days, the colony was identified by PCR and Sanger*

*sequencing. The sample collection process was performed until successful Fn identification. The bacteria were stored at -80°C. Results: The Fn was successfully isolated and stored. Conclusion: Fn is a major putative oral pathogen. This pure bacterial culture will be helpful for other experimental studies in dental and medical areas.*

**Keywords:** *Fusobacterium nucleatum, bacterial culture, periodontitis, PCR analysis*

---

Received: 16/08/2021

Revised: 17/10/2021

Accepted for publication: 18/10/2021