Ministry of Higher Education and

Scientific Research

University of Mosul

The role of bacteria in causing coronary atherosclerosis in patients who underwent catheter interventions for the coronary arteries in Mosul/Iraq

Haqy Yazan Ismail Ali

M.Sc. Thesis

In

Biology / Microbiology

Supervised By

Asst. Prof.

Saba Abdul Salam Hamid Al-Sultan

1445 A.H **2023 A.D**

Abstract

The study aimed to investigate and survey the role and effect of bacteria as a cause of Coronary Atherosclerosis in patients who underwent cardiac catheterization of the Coronary Arteries to perform Coronary angioplasty between 28/11/2022 to 15/4/2023 from Mosul Center for Cardiology and Cardiac Surgery (MCCCS), Hundred balloon samples and 33 saliva samples were collected from 100 patients, with an average age of 41-82 years, were males 69%, and females 31%.

According to the design of the experiment in this research, two types of culture media were adopted to detect bacterial infection in addition to molecular diagnosis in balloon and saliva samples. The number of isolates was 75 out of 133 samples, or 56.39%. Gram-negative bacteria excelled in the number of isolates out of the total methods of isolation and diagnosis. 52 out of 75 isolates, representing (69.3%) and 39.1% of the total number of samples, (were 133 samples). The number of gram-positive bacteria isolates from the total methods of isolation and diagnosis were 23 isolates out of 75, or 30.6%, or 17.29% of the total number of samples, 133 samples. Isolates were diagnosis depended on phenotypic (morphological, Biochemical, and physiological) test, and were confirmed using Vitek-2 system, *Stutzerimonas stutzer* was 6.6%, 5 isolates, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* were 2.6% two isolates for each one of them, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lentus*, and the second type of media, is Selective media (Colombia Blood Agar and Modified Colombia Urea Agar) to isolate *Helicobacter pylori* and related genera, (18 isolates with 24% from 75 different isolates and 13.5% from 133 total samples) bacteria of the genus *Helicobacter spp*. and *Campylobacter spp*. As it was relied upon in its diagnosis that the media used are selective media, the rapid Urease test, the Catalase and Oxidase test, the unique shape of colonies, and the shape of bacteria after staining them with the differential gram stain.

The ability of pure isolates for biofilm conformation using Congo Red Medium was at (61.9 %), and this ability was confirmed using Scanning Electron Microscope with different magnification powers, which showed the stages of biofilm formation resulting from bacterial infection, and the formation of fat streaks, and access to Coronary Atherosclerosis (CA).

Molecularly confirmed by observing the genetic sequencing of the *16SrRNA* universal gene, of four strains of the species Stutzerimonas *stutzeri* in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with a matching ratio ranging from 96.59% to 97.47%, then registered as new strains by names *Stutzerimonas stutzeri strain* HaSa1 (OQ726131), *Stutzerimonas stutzeri* strain HaSa2 (OQ726132). *Stutzerimonas stutzeri* HaSa3 strain (OQ726133), *Stutzerimonas stutzeri* strain HaSa4 (OQ726134).

To reveal the relationship between oral, and dental health with Atherosclerosis in terms of bacterial infection, DNA was extracted from 36 samples from balloons, and saliva directly. In the beginning, *16SrRNA* universal gene and approved primers were used to identify, and diagnose *Helicobacter pylori*, being the primary suspect as a cause of Atherosclerosis, the results showed that from 36 samples (12 from the balloon and 12 from the saliva) give positive results for *Helicobacter pylori* (100%) by using specialized primers for molecular diagnosis, and 12 give positive results for different bacteria by using *16SrRNA*. and the isolation results were 36 from 75 different isolates obtained with an isolation rate of 48%. and 27.1% of the total 133 samples.

when the genetic sequence was detected, and the phylogenetic tree obtained, a positive and identical result was found between saliva, and balloons samples of the same patient, and the matching rate was 100%. However, and the results of detecting the genetic sequence, as it showed identically with the NCBI *Campylobacter* that showed identicalness to the *Campylobacter showae* ATCC 51146, strain B32_SW, and strain 129_VTPP, with 10 isolates, with a percentage

of 13.3%, (5 for saliva, and 5 for the balloon sample). *Campylobacter concisus* strain P2CDO4, 10 isolates at 13.3% (5 for saliva and 5 for balloon) and *Helicobacter mustelae* 4 isolates identical to *Helicobacter mustelae* strain NCTC12198, and formed 5.3% two isolates each for saliva and balloon.

And when studying the phylogenetic tree resulting from the use of Nested PCR technology to detect partial sequences of 23SrRNA sequences using the MEGA-11 program at a length scale of 0.11.

The high affinity between the bacterial species belonging to the species *Helicobacter spp*. and *Campylobacter spp.* Strains with the reference strain in NCBI *Helicobacter pylori* ATCC 49503 (AP027941.1).

For the first time in Iraq, the topic of our current study was addressed due to the scarcity of available global research on this subject. Analyzes and investigations were conducted on the bacterial role as a cause of Coronary Atherosclerosis.

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى التحقق من دور البكتيريا وتأثيرها كمسبب لتصلب الشرايين التاجية في المرضى الذين خضعوا لعملية القسطرة القلبية لاجراء رأب للشرايين التاجية في فترة من ٢٨ ايلول ٢٠٢٢ إلى ١٥ نيسان ٢٠٢٣ في مركز الموصل لأمراض القلب وجراحة القلب (MCCCS) ١٠٠ عينة من البالون و ٣٣ عينة لعاب من ١٠٠ مريض، وكانت الفئة العمرية للمرضى بين ٤١ و ٨٢ سنة، وكانت نسبة الذكور ٦٩٪ والإناث ٣١.%

اعتمد نوعين من الاوساط الزرعية لاكتشاف العدوى البكتيرية بالاضافة الى التشخيص الجزيئي في عينات البالون واللعاب وبلغ عدد العزلات ٧٥ عزلة من اصل ١٣٣ عينة اي بنسبة 56.39% وتفوقت البكتريا السالبة لصبغة كرام في عدد عزلاتها من اجماالي طرق العزل والتشخيص وكانت ٥٢ عزلة من ٧٥ عزلة بنسبة 69.3% و 39.1% من اجمالي عدد العينات ١٣٣ عينة وعدد عزلات البكتريا الموجبة لصبغة كرام من اجمالي طرق العزل والتشخيص ٢٣ عزلة من ٧٥ عزلة اي بنسبة 30.6% ونسبة 17.29% من اجمالي عدد العينات ١٣٣ عينة .

تم تشخيص العزلات اعتمادا على الفحوصات (الصفات المظهرية , الكيموحيوية و فيسيولوجية) ، وتم تأكيد التشخيص باستخدام جهاز Vitek-2 Compact وتم تحديد أنواع العزلات بالنسب التالية : *Stutzerimonas stutzer* بنسبة ٦.٦٪ (٥ عزلات)، *Pseudomanas aeruginosa* و *Staphylococcus epidermidis* بنسبة ٢.٦٪ (عزلتان لكل منهما) و *Staphylococcus haemolyticus* و *Staphylococcus hominis* و *Stapphylococcus lentus* ١.٣٪.

والنوع الثاني من الاوساط الزرعية هو الاوساط الانتقائية (Colombia Blood Agar و Modefied Colombia Urea Agar) لعزل *Helicobacter pylori* والاجناس القريبة منها ، للبكتيريا من جنس *Helicobacter* spp.. و *Campylobacter* spp.. تبلغ ١٨ عزلة بنسبة ٢٤٪ من

٧٥ عزلة و ونسبة عزل ١٣.٥٪ من اجمالي ١٣٣ عينة . وتم اعتماد التشخيص على كونها نامية على الاوساط الانتقائية واختبار اليوريا السريع واختبارات الكتاليز , والأوكسيديز وشكل المستعمرات وشكل البكتيريا بعد تلوينها بصبغة غرام التفاضلية.

تم اختبار قدرة العزلات البكتيرية المنقية المحددة على تكوين أغشية حيوية على وسط Congo Red، وبلغت النسبة الإجمالية للعزلات التي التي اعطت نتيجة موجبة للاختبار على وسط Congo Red ٦١.٩٪.

تم تاكيد القابيلة أيضًا باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح بتكبيرات مختلفة، والذي أظهر مراحل تكوين الأغشية نتيجة للعدوى البكتيرية وتكوين الخطوط الدهنية والوصول إلى تصلب الشرايين التاجية.

تم تأكيد الاصابات البكتيرية بالاختبارات الجزيئية من خلال الكشف عن تسلسل الجيني لـ 16s rRNA، لأربعة عزلات من بكتيريا *Stutzerimonas stutzeri* مع نسب تطابق تتراوح بين ٩٦.٥٩٪ إلى ٩٧.٤٧ وكانت عزلات جديدة وسجلت السلالات تحت أسماء *Stutzerimonas stutzeri* strain HaSa1 (OQ726131)، *Stutzerimonas stutzeri* strain HaSa2 (OQ726132)، *Stutzerimonas stutzeri* HaSa3 strain (OQ726133)، *Stutzerimonas stutzeri* strain HaSa4 (OQ726134). في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) .

تم في هذه الدراسة الكشف عن العلاقة بين صحة الفم والأسنان وتصلب الشرايين التاجية من حيث العدوى البكتيرية، تم استخراج الحمض النووي (DNA) من ٣٦ عينة من البالون واللعاب مباشرةً. في البداية تم استخدام, تسلسل الجيني لـ 16s rRNA و البادئات (Primers) المتخصصة في تشخيص *Helicobacter pylori* ، التي تعتبر المتهمة الاولى كمسبب لتصلب الشرايين التاجية والذي

تم تأكيده في معظم الأبحاث والدراســـات. أظهرت النتائج أن من ٣٦ عينة (١٢ من البالون و ١٢ من اللعاب) أعطت نتائج إيجابية لـــــ (100%) *Helicobacter pylori* باسـتخدام البادئات (Primers) المتخصـصــة و ١٢ عينة أعطت نتائج إيجابية لأنواع بكتيرية مختلفة باسـتخدام تسـلسـل الجيني ل 16s rRNA وكانت نســـبة ٤٨٪ من ٧٥ عينة و ٢٧.١٪ من اجمالي عدد العينات . ثم تم اســـتخدام نفس الحمض النووي المستخرج للكشف تسلسل الجين للحصول على أدق النتائج، وعند كشف التسلسل الجيني الحصـول على الشـجرة الوراثية تبينت المطابقة التامة ١٠٠٪ في تشـخيص الانواع البكتيرية بين عينات اللعاب والبالون لنفس المريض .

ومما تجدر الاشــارة اليه بوجود اختلاف بين نتائج باســتخدام البادئات (Primers) المتخصــصــة ونتائج الكشـف عن التسـلسـل الجيني، حيث أظهر الاخير تطابق جنس *Campylobacter* المشـخص مع *Campylobacter showae* ATCC 51146 والســـلالات B32_SW و129_VTPP في NCBI ، بعدد ١٠ عزلات، بنســـبة ١٣.٣٪ (٥ للعاب و ٥ لعينات البالون)، و *Campylobacter concisus* سلالة P2CDO4 بعدد ١٠ عزلات بنسبة ١٣.٣٪ (٥ للعاب و ٥ للبالون) واربع عزلات لـ *Helicobacter mustelae* سلالة NCTC12198 بنسبة ٥.٣٪ (٢ للعاب و ٢ للبالون).

وعند دراســة الشــجرة الوراثية الناتجة من اســتخدام تقنية Nested PCR للكشــف عن التســلسـل الجزئي لتسلسلات 23SrRNA باستخدام برنامج MEGA-11 بمقياس طول ٠.٠١١.

تبين التقارب الكبير بين الانواع البكتيرية التابعة لـــــــلاجناس *Helicobacter* spp.. و *Campylobacter* spp.. المعزولـة مع الســـلالـة المرجع في NCBI *Helicobacter pylori* (ATCC 49503(AP027941.1) .

من المهم ملاحظته من نتائج هذه الدراسة ، ان هذا المرض ناتج عن عوامل عديدة وتبين ايضا ان الاصابات البكتيرية ناتجة عن اكثر من نوع بكتيري اي اصابات مختلطة.

ولأول مرة في العراق تم تناول موضـــوع دراســـتنا الحالية وذلك لندرة البحوث العالمية المتوفرة حول هذا الموضوع ، فقد تم إجراء تحاليل واستقصاءات حول الدور البكتيري كمسبب لتصلب الشرايين التاجية.

وزارة التعليم العالي والبحث العملي

جامعة الموصل

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التأثير البكتيري كمسبب لتصلب الشرايين التاجية للمرضى التي تجرى لهم تداخلات قسطارية للشرايين التاجية

حقي يزن اسماعيل علي

رسالة ماجستير

علوم الحياة / الأحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

صبا عبدالسلام حامد السلطان

١٤٤٥هـ ٢٠٢٣ م