

**ОПЫТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЖИДКОСТИ
НАЗАЛЬНОГО ЛАВАЖА ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И
ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ЛЕГКИХ У
ПАЦИЕНТА С МУКОВИСЦИДОЗОМ**

Кондратенко О. В.¹,

Лямин А. В.¹,

Ерещенко А. А.¹,

Антипов В. А.¹

¹ ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава РФ, Самара, Российская Федерация

**MICROBIOLOGICAL MONITORING OF NASAL LAVAGE FLUID AS A
METHOD FOR EARLY DETECTION AND PREVENTION OF
BACTERIAL LUNG COMPLICATIONS IN A PATIENT WITH CYSTIC
FIBROSIS**

Kondratenko O. V.^a,

Lyamin A. V.^a,

Ereshchenko A. A.^a,

Antipov V. A.^a

^a Samara State Medical University of MH RF, Samara, Russian Federation

Резюме. Тяжесть осложнений при муковисцидозе определяется микроорганизмами, колонизирующими нижние дыхательные пути. Параназальные синусы способны быть резервуаром агрессивных патогенов. Нами был разработан способ сбора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с муковисцидозом для микробиологического исследования. В качестве клинического примера, иллюстрирующего возможности применения данной методики, приводится описание динамики микрофлоры пациента с муковисцидозом. У пациента отмечалась клиническая и микробиологическая картина эрадикации *P.aeruginosa* из легочной ткани, в связи с чем было остановлено проведение антибактериальной терапии. Спустя 6 месяцев было проведено исследование микрофлоры жидкости назального лаважа пациента с параллельным посевом мокроты. Получен рост культуры *P.aeruginosa* 10^2 КОЕ/мл, в мокроте не было получено роста культуры *P.aeruginosa*. Для решения вопроса о происхождении данного штамма была проведена оценка степени генетического родства между 5 штаммами, полученных от пациента в период с 2008 по 2016 год на основании их белкового профилирования. В качестве контрольного штамма был использован типовой штамм *P.aeruginosa* ATTC 27853. Установлено, что штаммы, выделенные от пациента в 2009 и 2016 гг. являются идентичными. Это обстоятельство свидетельствует о том, что проведенная антибактериальная терапия привела к эрадикации возбудителя в ткани легких, но при этом не затронула его в верхних дыхательных путях. Спустя 3 месяца вновь был получен рост культуры *P.aeruginosa* в мокроте. Пациенту назначена антибактериальная терапия, включающая введение ингаляционных антибактериальных препаратов в параназальные синусы. При повторном исследовании жидкости назального лаважа с параллельным посевом мокроты пациента спустя 3 месяца получен рост культуры *P.aeruginosa* 10^1 КОЕ/мл из жидкости назального лаважа, отмечена тенденция к снижению титра возбудителя в верхних дыхательных путях. В мокроте роста культуры *P.aeruginosa* получено не было. Пациент отнесен к группе риска по

колонизации дыхательных путей штаммами из верхних дыхательных путей. Клинический пример иллюстрирует необходимость и актуальность проведения регулярного микробиологического исследования жидкости назального лаважа с целью раннего выявления клинически значимых возбудителей и проведения профилактических мероприятий по недопущению их распространения в нижних дыхательных путях.

Ключевые слова: муковисцидоз, назальный лаваж, нижние дыхательные пути, параназальные синусы, мокрота, MALDI-ToF масс-спектрометрия.

Abstract. The severity of complications in cystic fibrosis are determined by microorganisms colonizing the lower airways. Paranasal sinuses can be a reservoir of aggressive pathogens. We have developed a method for collection and primary inoculation of nasal lavage fluid from cystic fibrosis patients for microbiological investigation. As a clinical case illustrating the feasibility of this technique, we describe the dynamics of the microflora composition in a patient with cystic fibrosis. The patient had a clinical and microbiological picture of *P.aeruginosa* eradication from the lung tissue, owing to which the antibacterial therapy was stopped. Six months later, the microflora in the nasal lavage fluid and sputum were assessed in parallel. The growth of *P.aeruginosa* (10^2 CFU/mL) but not *P.aeruginosa* in sputum was detected. To determine origin of this strain, the degree of genetic relationship between 5 strains obtained from the patient from 2008 to 2016 was assessed based on bacterial protein profiling. A typical strain of *P.aeruginosa* ATTS 27853 was used as a control. Strains isolated from the patient in 2009 and 2016 were identical suggesting that the antibacterial therapy led to eradication of *P.aeruginosa* in the lungs, but not in the upper airways. Four months later, the growth of *P.aeruginosa* was found in sputum. The patient was prescribed to use antibacterial drugs inhaled into paranasal sinuses. Repeated test performed 3 months later resulted in growth of *P.aeruginosa* 10^1 CFU/mL from nasal lavage fluid, but not from sputum. The patient

was referred to a risk group on airway colonization by pathogen strains derived from the upper airway tract. The clinical example illustrates relevance of conducting a regular microbiological study of nasal lavage fluid in order to early identify clinically significant pathogens to prevent their spread to the lower airway tract.

Keywords: cystic fibrosis, nasal lavage, lower airways, paranasal sinuses, sputum, MALDI-Tof mass spectrometry.

1 **Introduction.** Cystic fibrosis is the most common genetic pathology. The
2 prognosis of the disease, in most cases, will be determined by bacterial pathogens
3 colonizing the lower airways (LA) [1-3]. The works of foreign authors show that
4 paranasal sinuses are able to be a reservoir for infection and a zone for adapting
5 aggressive clones. Such pathogens are *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia*
6 *cepacia complex*, MRSA and others, which become sources of infection with LA [5,
7 6]. A unified algorithm for the study of nasal sinus microflora in patients with cystic
8 fibrosis has not been developed in the Russian Federation at the moment. We have
9 developed a method for collecting and primary inoculation of nasal lavage fluid from
10 cystic fibrosis patients for microbiological examination (Patent for Invention No.
11 2659155) [4].

12 As a clinical example illustrating the possibility of using this method in the
13 practical work of doctors of centers for the treatment of cystic fibrosis, we describe
14 the dynamics of the microflora of patient R. Patient is 16 years old and is being
15 monitored at the center for the treatment of cystic fibrosis with a diagnosis: Cystic
16 fibrosis, mixed form, severe course. delF508/N1303K mutations. The diagnosis was
17 made at the age of two, in 2004. From 2004 to 2014, the sputum showed an increase
18 in *P. aeruginosa*. During antibacterial therapy from 2014 to 2016, a clinical and
19 microbiological picture of eradication of the pathogen from pulmonary tissue was
20 noted (in accordance with the requirements of the European Consensus: Early
21 therapy and prevention of lung damage in cystic fibrosis (2004) - presence of at least
22 three times negative crops within six months)) [7]. Considering the clinical
23 improvement and the results of the microbiological study in 2016, antibacterial
24 therapy for *P.aeruginosa* was discontinued. In November 2016, a parallel research
25 of the microflora of nasal lavage fluid and sputum was conducted. The study resulted
26 in growth of *P.aeruginosa* 10^2 CFU/mL culture in nasal lavage fluid with no growth
27 of *P.aeruginosa* culture in sputum.

28 For the period from 2008 to 2016, we preserved 5 strains of *P.aeruginosa*
29 isolated from this patient, including a strain obtained from nasal lavage fluid.
30 Considering the previous clinical and microbiological picture of eradication from

31 LA, it was unclear whether this was colonization of paranasal sinuses with a new
32 strain of *P.aeruginosa*, or whether the strain was eroded from LA, but was able to
33 persist in the sinuses. In order to understand these epidemiological aspects, we
34 assessed the degree of genetic relationship between strains obtained from the patient
35 at different times based on their protein profiling. For this purpose, protein spectrums
36 of strains were obtained using the formic acid extraction method. The results were
37 then cluster analyzed using the time-of-flight MALDI-Tof mass spectrometry
38 method.

39 The strains obtained from the patient were numbered from 1 to 5, while strain
40 1 was obtained in July 2008 (sputum), strain 2 - in March 2009 (sputum), strain 3 -
41 in May 2009 (sputum), strain 4 - in December 2008 (sputum), strain 5 - in November
42 2016 (nasal lavage liquid). Typical strain *P.aeruginosa* ATTS 27853 (strain 6) was
43 used as a control strain for dendrogram construction. The obtained data were
44 visualized using a cluster dendrogram (Figure).

45

46 **Figure 1.** Cluster dendrogram constructed by using 5 strains isolated from
47 patient R. (1-5) and a typical strain of *P.aeruginosa* (6).

48

49 The dendrogram shows that strains from 1 to 5 have signs of genetic
50 relationship. At the same time strain 6 is significantly distanced from them. Strains
51 1 and 3 as well as 4 and 5 are found to be descendants of the same clone. Strains 1
52 and 3, as well as 4 and 5 have a minimum distance level, which allows them to be
53 considered genetically identical. The presented dendrogram clearly demonstrates
54 that the strains isolated from the patient in 2009 and 2016 are identical. This
55 circumstance indicates that the conducted antibacterial therapy led to the eradication
56 of the pathogen in the lung tissue, but did not affect it in the upper airways (UA). In
57 March 2017, the patient's sputum was retested. The recommended sinus debridement
58 was not carried out due to the low compliance of the patient, taking into account his
59 age characteristics. In sputum, growth of the *P.aeruginosa* culture was obtained
60 again. Analyzing the results of the microbiological research, the patient was re-

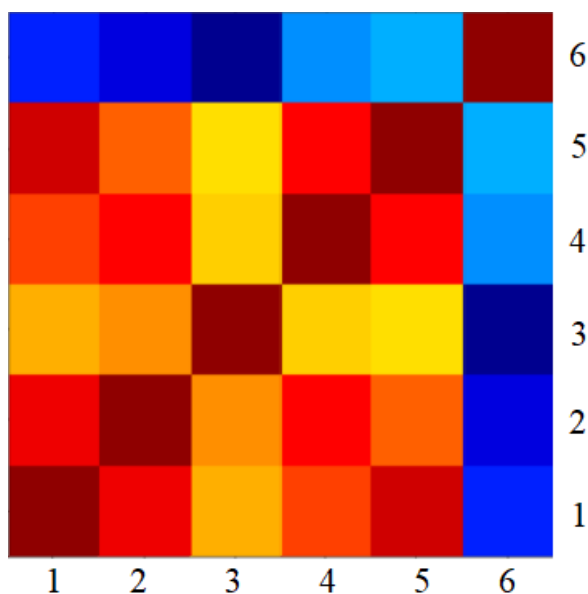
61 prescribed antibacterial therapy for this pathogen. It included not only nebulizer
62 therapy with LA, but also the introduction of inhaled antibacterial drugs into
63 paranasal sinuses. In June 2018, a retest of the nasal lavage fluid with parallel culture
64 of the patient's sputum was performed. As a result of testing of the nasal lavage fluid,
65 growth of the culture of *P.aeruginosa* 10^1 CFU/ml was obtained. Thus, there was a
66 tendency towards a decrease in the titer of the pathogen in UA. No growth of
67 *P.aeruginosa* culture was obtained in sputum after antibacterial therapy. However,
68 the persistence of the strain in UA suggests the possibility of its appearance in
69 sputum in the coming months, if the corresponding therapy with UA is not
70 continued. This patient is considered by us as being at risk for airway colonization
71 of strains from UA.

72 This clinical example clearly illustrates the necessity and relevance of
73 conducting a regular microbiological study of nasal lavage fluid in order to early
74 identify clinically significant pathogens and carry out preventive measures to
75 prevent their spread in the LA.

76 **Acknowledgements.** The authors express gratitude to the head of the Samara
77 Center for the Treatment of Cystic Fibrosis Vasilyeva Elena Alexandrovna for help
78 in organizing the study.

РИСУНКИ

Figure 1. Cluster dendrogram constructed by using 5 strains isolated from patient R. (1-5) and a typical strain of *P. aeruginosa* (6).



Note: Mass spectrums of bacterial strains are located along the Y- axis (vertical line) from bottom to top of the dendrogram, along the X-axis (horizontal lines) from left to right of the dendrogram. The color of the cell reflects the degree of affinity of the corresponding strain pair. The range of cell colors corresponds to the thermal imaging scale from dark blue (with absolute difference in strains) to dark red (with complete coincidence).

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Ерещенко Алена Анатольевна – ассистент кафедры фундаментальной и клинической биохимии с лабораторной диагностикой Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89, тел. +79631163151, e-mail: pustychnica131902@gmail.com

Ereshchenko Alena Anatolyevna – assistant of the chair of fundamental and clinical biochemistry with laboratory diagnostics Federal State Budgetary Institution of Higher Education "Samara State Medical University" of the Ministry of Health of Russia, 443099, Samara, Chapayevskaya str., 89, tel. +79631163151, e-mail: pustychnica131902@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Кондратенко Ольга Владимировна, д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

Kondratenko Olga Vladimirovna, PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Microbiology, Allergology and Immunology, Samara State Medical University, Russian Federation.

Лямин Артем Викторович, д.м.н., профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России

образования «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава России

Lyamin Artem Viktorovich, PhD, MD (Medicine), Associate Professor,
Department of Clinical Microbiology, Allergology and Immunology, Samara State
Medical University, Russian Federation.

Антипов Владимир Александрович, ассистент кафедры фундаментальной и
клинической биохимии с лабораторной диагностикой Федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Самарский государственный медицинский университет»
Минздрава России

Antipov Vladimir Alexandrovich, assistant, Department of fundamental and
clinical biochemistry with laboratory diagnostics, Samara State Medical University,
Russian Federation.

Блок 3. Метаданные статьи

ОПЫТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ЖИДКОСТИ
НАЗАЛЬНОГО ЛАВАЖА ДЛЯ РАННЕГО ВЫЯВЛЕНИЯ И
ПРОФИЛАКТИКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ЛЕГКИХ У
ПАЦИЕНТА С МУКОВИСЦИДОЗОМ

MICROBIOLOGICAL MONITORING OF NASAL LAVAGE FLUID AS A
METHOD FOR EARLY DETECTION AND PREVENTION OF BACTERIAL
LUNG COMPLICATIONS IN A PATIENT WITH CYSTIC FIBROSIS

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

МУКОВИСЦИДОЗ, НАЗАЛЬНЫЙ ЛАВАЖ
CYSTIC FIBROSIS, NASAL LAVAGE FLUID

Ключевые слова: муковисцидоз, назальный лаваж, нижние дыхательные
пути, параназальные синусы, мокрота, MALDI-ToF масс-спектрометрия.

Keywords: cystic fibrosis, nasal lavage, lower airways, paranasal sinuses, sputum, MALDI-Tof mass spectrometry.

Краткое сообщение.

Количество страниц текста – 3, количество таблиц – 0, количество рисунков – 1.

26.10.2022.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
1	Козлов А.В. Хроническая инфекция дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом: обмен железа и его значение. Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2019, № 4, С. 62-67.	Kozlov A.V. Chronic respiratory tract infection in patients with cystic fibrosis: metabolism of iron and its significance. Immunopathology, Allergology, Infectology, 2019, no 4, pp. 62-67. (In Russ.).	https://doi.org/10.14427/jipai.2019.4.62.
2	Козлов А.В., Гусякова О.А., Ерещенко А.А., Халиулин А.В. Диагностические возможности современного биохимического исследования	Kozlov A.V., Gusyakova O.A., Ereshchenko A.A., Khaliulin A.V. Diagnostic possibilities of modern biochemical study of sputum from patients	https://doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-1-24-28

	<p>мокроты у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика, 2019, Т. 64. № 1, С. 24-28.</p>	<p>with cystic fibrosis (literature review). Russian Clinical Laboratory Diagnostics, 2019, vol. 64. no 1, pp. 24-28. (In Russ.).</p>	
3	<p>Козлов А.В., Лямин А.В., Жестков А.В., Гусякова О.А., Халиулин А.В. Обмен железа в бактериальной клетке: от физиологического значения к новому классу антимикробных препаратов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2022, Т. 24. № 2, С. 165-170.</p>	<p>Kozlov A.V., Lyamin A.V., Zhestkov A.V., Gusyakova O.A., Khaliulin A.V. Iron metabolism in bacterial cells: from physiological significance to a new class of antimicrobial agents. Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2022, vol. 24. no 2, pp. 165-170. (In Russ.).</p>	<p>https://doi.org/10.36488/cma.c.2022.2.165-170</p>

4	Кондратенко О.В., Лямин А.В., Медведева А.В., Ермолаева А.Д. Способ сбора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с муковисцидозом для микробиологического исследования. Патент РФ на изобретение RU 2659155 С1 28.06.2018.	Kondratenko O.V., Lyamin A.V., Medvedeva E.D., Ermolaeva A.V. Method of collection and primary sowing of nasal lavage fluid from patients with cystic fibrosis for microbiological examination. Patent on invention RU 2659155 C1 28.06.2018 (In Russ.).	http://www.findpatent.ru/patent/265/2659155.html
5	Berkhout M.C., Rijntjes E., El Bouazzaoui L.H., Fokkens W.J., Brimicombe R.W., Heijerman H.G. Importance of bacteriology in upper airways of patients with Cystic Fibrosis. J Cyst Fibros., 2013, vol. 12, no.5, pp.525- 9.		https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.01.002

6	Choi K.J., Cheng T.Z., Honeybrook A.L., Gray A.L., Snyder L.D., Palmer S.M., Abi Hachem R., Jang D.W. Correlation between sinus and lung cultures in lung transplant patients with cystic fibrosis. Int Forum Allergy Rhinol, 2018, vol. 8, no. 3, pp.389-393.		https://doi.org/10.1002/alr.22067
7	Döring G., Hoiby N. Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. J Cyst Fibros., 2004, vol. 3, no. 2, pp.67-91.		https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.03.008